Matheus Santos de Sousa Fernandes

Efeitos do treinamento físico na doença hepática gordurosa
não alcoólica em camundongos: aspectos relacionados à
biogênese mitocondrial, estresse oxidativo hepático e muscular

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Pinto Marques
Souza de Oliveira

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fernandes, Matheus Santos de Sousa

Efeitos do treinamento físico na doença hepática gordurosa não alcoólica em camundongos : aspectos relacionados à biogênese mitocondrial, estresse oxidativo hepático e muscular / Matheus Santos de Sousa Fernandes. -- São Paulo, 2019.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientadora: Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira.

Descritores: 1.Exercício Físico 2.Hepatopatia gordurosa não alcoólica 3.Biogênese de organelas 4.Treinamento físico 5.Fígado 6.Metabolismo 7.Camundongos 8.Estresse oxidativo

USP/FM/DBD-227/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Matheus Santos de Sousa Fernandes

Efeitos do treinamento físico na doença hepática gordurosa
não alcoólica em camundongos: aspectos relacionados à
biogênese mitocondrial, estresse oxidativo hepático e muscular

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Pinto Marques
Souza de Oliveira

São Paulo

2019

“Porque para Deus não há nada impossível”

Lucas 1:37

(Bíblia Sagrada)

“Agradeço a Deus, meu Senhor, aos meus pais, Juberlândia Santos e João Fernandes, além da minha esposa Gabriela, que me auxiliaram a chegar nesta etapa fundamental da minha vida.”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer ao meu Deus por ser responsável por transformar a minha a vida em tudo que sou hoje. Aos meus pais, Juberlândia Santos de Sousa Fernandes e João Fernandes, por tudo que representam na minha vida e por terem sempre acreditado em mim. A minha esposa Gabriela Carvalho pelo amor, companheirismo, dedicação, compreensão de todos os dias.

A Professora Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, Professora Associada do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pela orientação, amizade, paciência e excelente profissionalismo, que é um exemplo de pessoa e profissional que investe na formação humana e técnico-científica de seus alunos.

Ao Professor Dr. José Stefano Tadeu, Pesquisador do Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pela amizade, orientações, conselhos e conversas diárias que favoreceram e favorecem o meu crescimento acadêmico e humano.

A Professora Márcia Kubrusly, Pesquisadora da Laboratório de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-37/FMUSP), pelo auxílio, amizade e paciência no auxílio a execução de todos os experimentos de Biologia Molecular referentes ao nosso projeto.

A Professora Fabiana Evangelista, da Faculdade de Artes e Ciências Humanas da Universidade de São Paulo (EACH/USP) pelas brilhantes orientações, paciência e companheirismo durante todo o protocolo experimental realizado em seu laboratório.

A Professora Claudia Jacques Lagranha, Professora Adjunta IV do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão - Universidade Federal de Pernambuco

(CAV/UFPE), pela colaboração e empenho nos aspectos relacionados aos experimentos, ensinamento relacionados ao metabolismo oxidativo.

A Vilma Libério, secretária da Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo empenho, amizade, paciência e dedicação em todos os aspectos burocráticos.

A Lucas de Lucena, amigo e colega de trabalho presente em diversos momentos de minha vida. E a todos os demais colegas e amigos que de algum modo me ajudaram em mais este passo da minha vida.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas	11
Lista de Símbolos	14
Lista de Figuras:	15
Lista de Formúlas	18
1.INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica	25
1.2 Sedentarismo e DHGNA	26
1.3 DHGNA, Estresse Oxidativo e Exercício Físico	29
1.4 DHGNA, Biogênese Mitocondrial e Exercício Físico	32
1.5 Modelo experimental, exercício físico e dhgna	36
1.6 Justificativa	37
2.OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo Geral.....	39
2.2 Objetivos Específicos	39
2.3 Hipóteses de Pesquisa.....	39
3. METÓDOS.....	40
3.1 Delineamento e Local do Estudo	41
3.2 Procedimentos experimentais e delineamento do estudo	41
3.3 Protocolo de Treinamento Físico	42
3.4 Teste de esforço físico máximo	43
3.5 Avaliações metabólicas	44
3.6 Procedimento de Eutanásia	44
3.7 Avaliação Histológica	44
3.8 Expressão Gênica	45

3.9 Extração do RNA Tecidual.....	45
3.10 Quantificação e Análise da Integridade do RNA Total.....	45
3.11 Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa Quantitativa Relativa (RT-qPCR)	46
3.12 Sequência de Oligonucleótidos para Expressão Gênica	47
3.13 Método de Análise da expressão Gênica	47
3.14 Atividade enzimática, biomarcadores e complexo não enzimáticos ligados ao estresse oxidativo.....	47
3.15 Citrato Sintase	47
3.16 Atividade de superóxido dismutase (SOD)	48
3.17 Catalase.....	48
3.18 Malonaldeído (MDA)	48
3.19 Carbonilas	49
3.20 Sulfidrilas.....	49
3.21 Glutathione S Transferase (GST).....	49
3.22 Estado redox via Glutathione reduzida (GSH) e Glutathione oxidada (GSSG)	49
3.24 Análise Estatística	50
4. RESULTADOS	51
4.1 Caracterização amostral.....	52
4.2 Peso Corporal.....	52
4.3 Consumo de Água e Ração	54
4.4 Variáveis ligadas ao treinamento físico.....	56
4.5 Peso Absoluto e Relativo dos Órgãos e Tecidos.....	58
4.6 Peso Absoluto e Relativo do Fígado	59
4.7 Peso Absoluto e Relativo do Tecido Adiposo Retroperitoneal	60
4.8 Peso Absoluto e Relativo do Tecido Adiposo Periepididimal.....	61
4.9 Peso Absoluto e Relativo do Tecido Adiposo Inguinal	62

4.10 Histopatologia Hepática.....	63
4.11 Histopatologia Hepática por Hematoxilina e Eosina (HE).....	63
4.12 Análise Semi-Quantitativa de Parâmetros Histopatológicos Hepáticos..	63
4.13 Análise de Expressão Gênica Hepática	64
4.14 Expressão Gênica Muscular.....	66
4.15 Análise da Atividade Enzimática e Estresse Oxidativo Hepático.....	68
4.16 Citrato Sintase	69
4.17 Superóxido Dismutase.....	70
4.18 Catalase.....	70
4.19 Malonaldeído	71
4.20 Carbonilas	72
4.21 Sulfidrila.....	72
4.22 Glutathione S transferase (GST)	73
4.23 Glutathione oxidada (GSH)	73
4.24 Estado redox (GSH/GSSG)	74
4.25 β -hidroxiacetil-co-a desidrogenase.....	75
4.26 Análise da Treinabilidade Aeróbia por Atividade de Citrato sintase muscular.....	76
5. DISCUSSÃO.....	77
6. CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	93

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACETIL-COA	Acetil Coenzima A
ACC	Acetil co-A carboxilase
ALT	Alanina Aminotransferase
AMP	Adenosina Mono Fosfato
AMPK	Adenosina Mono Fosfato Kinase
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina Tri Fosfato
β-HAD	β -hidroxiacetil-co-A desidrogenasse
CAT	Catalase
CEUA	Comissão Ética para uso de animais
COL1	Proteína Colágeno tipo um
CO₂	Dióxido de Carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CHO	Carboidratos
CPT-1	Carnitine palmitoyltransferase 1
CTE	Cadeia Transportadora de Eletróns
DCNT	Doenças Crônicas Degenerativas Não Transmissíveis
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DM	Diabetes Mellitus
DNAm_t	Ácido Desoxirribonucléico Mitocondrial
DP	Desvio Padrão

EACH	Escola de Artes e Ciências Humanas
EHNA	Esteato Hepatite Não Alcoólica
ELN	Proteína Elastina
EO	Estresse Oxidativo
EROS	Espécies Reativas Produzidas pelo Oxigênio
FAS	Gene Sintetizador de Ácidos Graxos
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GLUT-2	Transportador de Glicose dois
GLUT-4	Transportador de Glicose quatro
GSH	Glutathione Peroxidase Reduzida
GSH/GSSG	Razão entre Glutathione Oxidada/Glutathione Disulfeto
GST	Glutathione S Transferase
GPx	Glutathione Peroxidase Oxidada
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HE	Hematoxilina e Eosina
HCR	Alta Capacidade Aeróbia
H₂O	Água
H₂O₂	Peroxido de hidrogênio
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IPAQ	Questionário Internacional de Atividade Física
IRS-1	Receptor de Substrato à Insulina 1
IRS-2	Receptor de Substrato à Insulina 2
LEP	Hormônio Leptina
LIM 07	Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental

LCR	Baixa Capacidade Aeróbia
MAX	Máximo
MET	Equivalente Metabólico
MIN	Mínimo
MPX	Mieloperoxidase
MTP	Proteína de Transferência de Triglicerídeos Microsossomais
NFKB	Fator Nuclear Kappa B
NRF-1	Fator Nuclear Respiratório 1
NRF-2	Fator Nuclear Respiratório 2
OB OB	Camundongos Obesos
PGC1-α Co-Ativador Alfa	Fator Proliferação Peroxisomal Ativador por Receptor Gama
PPAR-α	Fator Proliferação Peroxisomal Ativador por Receptor Alfa
PPAR-γ	Fator Proliferação Peroxisomal Ativador por Receptor Gama
RI	Resistência à Insulina
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SED	Sedentário
SREBP1C	Proteína de Ligação ao Elemento Regulador de Esterol
TF	Treinamento Físico
TFAM	Fator de Transcrição Mitocondrial A
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
USP	Universidade de São Paulo
VO₂	Volume de Oxigênio
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
WT	Animal tipo selvagem

Lista de Símbolos

% por cento

$\pm$ mais ou menos que

α alfa

β – beta

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

Δ – delta

ϵ – épsilon

γ – gama

μ - mi

m- metros

ng- nano grama

μl -microlitro

ml- mililitro

Lista de Figuras:

Figura 1. Efeitos do sedentarismo e baixa capacidade aeróbia, na progressão de processos fisiopatológicos da DHGNA.....	5
Figura 2. Mecanismo de produção de espécies reativas de oxigênio e excesso de ácidos graxos livres dentro hepatócito e suas consequências fisiopatológicas dentro da DHGNA.....	7
Figura 3. Lacunas e dificuldades encontradas na literatura em relação ao exercício físico dentro da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.....	8
Figura 4. Mecanismo de estimulação da biogênese mitocondrial via AMPK/PGC-1.....	10
Figura 5. Modificações celulares causadas pela EHNA em <i>Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats</i> ; em comparação com o grupo saudável.....	11
Figura 6. Fluxograma da distribuição dos grupos experimentais em sedentário e treinamento físico.....	18
Figura 7. Esteira Inbramed adaptada para realização do treinamento físico em oito semanas com camundongos ob ob.....	19
Figura 8. Local de Inclusão dos Camundongos ob/ob para realização do treinamento.....	19
Figura 9. Análise da Integridade do RNA total por eletroforese com agarose a 1%.....	23
Figura 10. Ganho de peso médio por animal por grupo experimental.....	32
Figura 11. Ganho de peso percentual médio por animal por grupo experimental.....	32
Figura 12. Evolução da variância do ganho de peso percentual médio por grupo experimental.....	33
Figura 13. Evolução da variância do ganho de peso percentual médio por grupo experimental.....	34
Figura 14. Comparação do Consumo Médio de água por grupo experimental após oito semanas de treinamento físico.....	34
Figura 15. Tabela da realização do consumo médio de ração por animal.....	34
Figura 16. Comparação do Consumo Médio de ração por grupo experimental após oito semanas de treinamento físico.....	35
Figura 17. Comparação da distância percorrida durante o teste de esforço realizado por grupo experimental em dois momentos do protocolo experimental (pré e pós oito semanas de treinamento físico).....	36
Figura 18. Comparação da duração no teste de esforço realizado por grupo experimental em dois momentos do protocolo experimental (pré e pós oito semanas de treinamento físico).....	36

Figura 19. Comparação da velocidade pico obtida no teste de esforço realizado por grupo experimental pré e pós oito semanas de treinamento físico.....	37
Figura 20. Peso absoluto do Fígado após oito semanas de treinamento físico.....	38
Figura 21. Peso relativo do Fígado após oito semanas de treinamento físico.....	38
Figura 22. Peso absoluto do tecido adiposo retroperitoneal após oito semanas de treinamento físico.....	39
Figura 23. Peso relativo do tecido adiposo retroperitoneal após oito semanas de treinamento físico.....	39
Figura 24. Peso Absoluto do tecido adiposo periepididimal após oito semanas de treinamento físico.....	40
Figura 25. Peso Relativo do tecido adiposo periepididimal após oito semanas de treinamento físico.....	40
Figura 26. Peso Absoluto do tecido adiposo inguinal após oito semanas de treinamento físico.....	41
Figura 27. Peso Relativo do tecido adiposo inguinal após oito semanas de treinamento físico.....	41
Figura 28. Análise do nível de expressão hepática do gene PGC1- α após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	44
Figura 29. Análise do nível de expressão hepática do gene CPT1- α após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	45
Figura 30. Análise do nível de expressão hepático do gene PPAR- α após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	45
Figura 31. Análise do nível de expressão hepática do gene SREBP1 após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	46
Figura 32. Análise do nível de expressão muscular do gene PGC1- α após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	47
Figura 33. Análise do nível de expressão muscular do gene CPT-1 α após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	48
Figura 34. Análise do nível de expressão muscular do gene PPAR- α após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	49
Figura 35. Análise do nível enzimático de citrato sintase hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	50
Figura 36. Análise do nível enzimático de SOD hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	51
Figura 37. Análise do nível enzimático de CAT hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	51

Figura 38. Análise do nível enzimático de MDA hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	52
Figura 39. Análise do nível enzimático de carbonilas hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	53
Figura 40. Análise do nível enzimático de sulfidrila hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	53
Figura 41. Análise do nível de glutathione S transferase hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	54
Figura 42. Análise do nível de glutathione oxidada hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	54
Figura 43: Análise do nível do estado redox hepática medido pela razão GSH/GSSG após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	55
Figura 44: Análise do nível enzimático de β -hidroxiacetyl-co-a desidrogenase hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	56
Figura 45: Análise da atividade enzimática de citrato sintase muscular após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.....	57

Lista de Formúlas**VO₂**

Volume de Oxigênio

(v) **Lista de tabelas:**

Tabela 1: Sequência de Oligonucleótidos sintetizados.....24

Tabela 2: Medida inicial do peso corporal dos animais, antes do início do protocolo de treinamento

físico.....31

Tabela 3: Análise Semi-Quantitativa de Parâmetros Histopatológicos Hepáticos.....

.42

Resumo:

Resumo

Fernandes MSS. *Efeitos do treinamento físico na doença hepática gordurosa não alcoólica em camundongos*: aspectos relacionados á biogênese mitocondrial, estresse oxidativo hepático e muscular [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma das formas mais comuns de doença hepática, que acomete cerca de 20% a 30% da população adulta, sendo encontrada mais frequentemente em indivíduos obesos (~90%). Dentre os principais fatores etiológicos estão: resistência à insulina, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo. Até o presente momento não há tratamento farmacológico específico para a DHGNA, por isso modificações no estilo de vida como redução do peso corporal (PC), dieta e prática regular de exercício físico são eficazes no combate a DHGNA. Entretanto ainda não está elucidado quais os principais impactos do exercício físico na DHGNA. **Objetivos:** Com isso, propusemos um estudo experimental que avaliou o efeito do treinamento físico sobre metabolismo oxidativo, funcionalidade mitocondrial hepática e muscular (soléo) e lipogênese hepática em modelo de DHGNA em camundongos obesos (*ob/ob*). **Métodos:** Utilizou-se 14 (*ob/ob*) com déficit em leptina e forma divididos em dois grupos: Sedentário (SED)=7 e treinados (TF=7) de acordo com o equilíbrio na média do PC. Estes animais foram submetidos a um protocolo de 8 semanas de treinamento físico aeróbio (TFA) a 60% da velocidade máxima obtida no teste de corrida realizado no último dia da semana de adaptação ao TFA. Na quarta semana foi realizado o reajuste da intensidade apenas nos TF e o teste de capacidade de corrida foi aplicado na oitava semana em ambos os grupos para se avaliar o desempenho dos animais nas variáveis ligadas ao TFA. Avaliou-se durante todo o protocolo: peso corporal (PC) em média, percentual, evolução do PC e consumo de água e ração. Na expressão gênica intra-hepática e muscular foram analisados: PGC-1 α , CPT-1 α e PPAR- α relacionados a funcionalidade mitocondrial, em adição analisou-se no fígado: SREBP1. No metabolismo oxidativo analisou-se: biomarcadores (MDA e carbonilas), atividade enzimática de SOD, CAT e GST, sistema antioxidante não enzimático: sulfidrilas, GSH e GSH/GSSG, enzimas metabólicas (Citrato sintase e β -HAD). Foi realizada análise histopatológica hepática por HE, além do peso absoluto e relativo dos tecidos hepático e adiposo branco

retroperitoneal, periepididimal e inguinal. Resultados: Na análise intergrupo em relação ao PC, observou-se redução significativa no grupo TF, assim como nos consumos de água e ração que foram significativamente menores após 8 semanas: Na análise de expressão gênica hepática encontramos aumento de PGC-1 α ($p=0,002$) e menor de CPT-1 α ($p=0,03$) no grupo TF após 8 semanas de TFA. No músculo Soléo encontramos maior expressão dos genes: PGC-1 α ($p=0,002$) e CPT-1 α ($p=0,01$). Em relação a MDA e carbonilas não houve diferença intergrupo, assim como em SOD, CAT e GST. Entretanto, quando analisamos o sistema antioxidante não enzimático, encontramos que os TF obtiveram maior nível de: sulfídrilas ($p=0,02$), GSH ($p=0,001$) e GSH/GSSG ($p=0,02$), além maior ativação das enzimas metabólicas: citrato sintase ($p=0,004$) e β -HAD ($p=0,01$). No peso dos órgãos, o TF demonstrou menor peso absoluto e relativo hepático e retroperitoneal. Na análise histológica, não houve diferença significativa. Conclusões: Nossos dados demonstram que TFA melhorou o controle do PC, hiperfagia e peso do fígado e retroperitoneal, funcionalidade mitocondrial e metabolismo oxidativo em (*ob/ob*) com DHGNA. Há necessidade uma intervenção a longo prazo com TFA, para que se possa visualizar possíveis melhorias histológicas.

Descritores: Exercício Físico; Hepatopatia gordurosa não alcoólica; Biogênese de organelas; Treinamento físico; Fígado; Metabolismo; Camundongos; Estresse oxidativo.

Abstract

Fernandes MSS. *Effect of Physical Training on obese mice with non - alcoholic fatty liver disease (NAFLD): aspects related to mitochondrial biogenesis, hepatic and muscular oxidative stress* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common forms of liver disease, affecting about 20% to 30% of the adult population, being found more often in obese individuals (~ 90%). Among the main etiological factors are insulin resistance, mitochondrial dysfunction and oxidative stress. To date, no specific pharmacological treatment for NAFLD, so lifestyle modifications such as: reduction in BW, diet and regular practice of physical exercise are effective, however it is not yet elucidated what the main impacts of physical exercise on NAFLD. Therefore, we proposed an experimental study that evaluated the effect of physical training on oxidative metabolism, hepatic and muscular mitochondrial function (soles) and hepatic lipogenesis in an ob / ob model of NAFLD. We used 14 (ob / ob) with leptin deficiency and divided into two groups: Sedentary (SED) = 7 and Trained (TF = 7) according to the mean BW balance. These animals were submitted to an 8-week protocol of aerobic physical training (AET) at 60% of the maximum velocity obtained in the running test performed on the last day of the week of adaptation to AET. In the fourth week the intensity adjustment was only done in the TF and the running capacity test was amplified in the eighth week in both groups to evaluate the performance of the animals in the variables linked to the AET. It was evaluated throughout the protocol: body weight (BW) on average, percentage, BW evolution and water and feed consumption. In the intrahepatic and muscular gene expression were analyzed: PGC-1 α , CPT-1 α and PPAR- α related to mitochondrial functionality, in addition liver was analyzed: SREBP1. In the oxidative metabolism, we analyzed: biomarkers (MDA and carbonyls), enzymatic activity of SOD, CAT and GST, non-enzymatic anti-oxidant system: sulfhydryl, GSH and GSH / GSSG, metabolic enzymes (Citrate synthase and β -HAD). Hepatic histopathological analysis was performed by HE, in addition to the absolute and relative weight of the hepatic and white retroperitoneal, periepididimal and inguinal adipose tissues. In the intergroup analysis in relation to BW, a significant reduction was observed in the TF group, as well as in the

water and feed intakes that were significantly lower after 8 weeks: In the analysis of hepatic gene expression we found an increase of PGC-1 α ($p = 0.002$) and CPT-1 α ($p = 0.003$) in the TF group after 8 weeks of AET. In the soleus we found higher expression of the genes: PGC-1 α ($p = 0.002$) and CPT-1 α ($p = 0.01$). In relation to MDA and carbonyls there was no intergroup difference, as in SOD, CAT and GST. When we analyzed the non-enzymatic anti-oxidant system, we found that the TF had a higher activity of: sulfhydryls ($p = 0.02$), GSH ($p = 0.001$) and GSH / GSSG ($p = 0.02$) metabolic enzymes: citrate synthase ($p = 0.004$) and β -HAD ($p = 0.01$). In the weight of the organs the TF showed lower absolute and relative hepatic and retroperitoneal weight. In the histological analysis, there was no significant difference. Our data demonstrate that AET improved BW control, hyperphagia and liver and retroperitoneal weight, mitochondrial functionality and oxidative metabolism in (ob / ob) with NAFLD. Long-term AET intervention is needed so that we can visualize possible histological improvements. We considered the effective AET to improve aspects related to NAFLD.

Descriptors: Physical exercise; Non-alcoholic fatty liver disease; Organelle biogenesis; Physical training; Liver; Metabolism; Mice; Oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

A Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma das formas mais frequentes de doença hepática, e está relacionada principalmente ao aumento progressivo da obesidade e sedentarismo ao redor do mundo. A doença hepática gordurosa não alcoólica engloba um espectro de modificações hepáticas que vão desde uma simples deposição de gordura intra-hepática, sem inflamação ou fibrose, a casos mais severos como: esteatohepatite não alcoólica (EHNA), cirrose e, carcinoma hepatocelular (CHC) [1].

A DHGNA está cada vez mais comum em todas as populações, principalmente a ocidental. Além disso, o processo de industrialização, desequilíbrio na ingestão de macro nutrientes e sedentarismo, contribuem para o desenvolvimento e progressão desta patologia. Em indivíduos obesos, a presença DHGNA contabiliza um percentual de ~90% ao redor do mundo [2]. A instalação da DHGNA possui alta complexidade e variedade de fatores etiológicos, dentre os quais destacam-se: obesidade, resistência à insulina (RI) e doenças cardiorrespiratórias [3]. A resistência insulínica é resultante do consumo excessivo de carboidratos (CHO), proporcionando translocação dos transportadores de glicose para membrana celular, com consequente aumento do influxo de glicose no interior da célula, reduzindo a funcionalidade dos receptores de insulina (IRS-1 e IRS-2) e incrementando a lipogênese [4,5].

Além disso, a RI é um dos principais fatores lipogênicos, uma vez que estimula o aumento na expressão de fatores lipogênicos como: Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP1C), responsável pela produção de triglicerídeos intra-hepáticos. Estes lipídios quando hidrolisados na forma de ácidos graxos livres, possuem três caminhos principais: (1) oxidação, (2) armazenamento intra-hepático e (3) exportação via circulação porta hepática, na forma da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Este processo, resulta no aumento da resposta inflamatória e incremento de espécies reativas do oxigênio (EROS) hepática. Culminando em características histológicas peculiares a DHGNA, tais como: Esteatose microvesicular, que consiste no acúmulo de pequenas gotículas de lipídios no citoplasma e no núcleo do hepatócito, sem proporcionar invasão a periferia celular. No entanto, a esteatose macrovesicular se caracteriza principalmente por uma grande quantidade de gordura,

denominada (“*lipids droplets*”) com invasão celular. Outro fator histológico importante consiste na balonização de hepatócitos que são submetidos há mudanças morfofuncionais ocasionadas pela deposição excessiva de lipídios na célula hepática [6].

A DHGNA, também está relacionada a síndrome metabólica, que consiste em múltiplos fatores associados, dentre eles: hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia, com a redução na lipoproteína de alta densidade (HDL), com consequente aumento nos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Esta lipoproteína é fundamental na síntese de placas ateromatosas presentes no lúmen do endotélio vascular. Outro fator importante consiste na ingestão de gorduras saturadas, que são responsáveis pela síntese de LDL e triglicerídeos. Este padrão de comportamento alimentar é frequentemente encontrado na população ocidental, e favorece a produção de resposta inflamatória e lipotoxicidade celular, afetando principalmente as mitocôndrias, responsáveis pela oxidação lipídica e por reações mediadas por oxigênio [7,8].

A inflamação possui papel fundamental na transição e progressão do estadiamento clínico de pacientes com DHGNA. Este mecanismo ocorre por ativação de macrófagos tipo 1, que realizam o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias: interleucina-2, 6 (IL-6 e IL-2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), atuando na ativação de células estreladas hepáticas quiescentes. Estas células atuam de forma direta na produção de colágeno tipo 1 (COL 1), elastina (ELN), queratina, que por seguinte estimulam a fibrogênese hepática, presente em estágios mais severos da DHGNA. [9,10,11].

1.2 Sedentarismo e DHGNA

O surgimento de novas tecnologias proporcionou ao ser humano benefícios importantes em seu cotidiano, entretanto, de maneira similar, pode proporcionar baixos níveis de atividade física, tornando cada vez mais as pessoas sedentárias [12]. Esta discussão é de suma importância, uma vez que o sedentarismo, associado a uma nutrição inadequada, contribui para o surgimento de doenças crônicas degenerativas não transmissíveis (DCNT's) e aumento na taxa de mortalidade entre homens e mulheres [13].

Bae e colaboradores [14] realizaram um estudo com 72.359 indivíduos coreanos não obesos, utilizando um questionário internacional de atividade física (IPAQ). Os resultados demonstraram uma associação entre os altos níveis de atividade física e redução no risco em obter DHGNA, melhora no perfil lipídico e redução nos valores de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Estes achados

indicam que pacientes fisicamente ativos possuem melhor condição hepática e bioquímica. Além disso, modificações no estilo de vida sedentário, previnem a instalação da DHGNA e comorbidades associadas.

Corroborando o estudo anterior, Tsunoda e colaboradores [15], aplicaram um questionário relacionado a prática de atividade física em 1149 pacientes japoneses com DHGNA, com objetivo de mensurar o tempo fisicamente ativo e a sua intensidade em equivalentes metabólicos (MET's). Demonstraram que pacientes regularmente ativos em intensidades de moderada (50-60% do VO_2 Max) e vigorosa (70-85%, do VO_2 Max) possuíram um melhor padrão bioquímico quando comparados aos pacientes sedentários.

Outro fator, apontado por Rector e colaboradores [16], responsável pelo surgimento da DHGNA é a baixa capacidade aeróbia. A mesma é conceitualmente definida por adaptações no sistema cardiorrespiratório mediadas por estímulos de predominância aeróbica, dentre os quais o exercício físico se destaca com um dos principais. Os resultados demonstraram que indivíduos que possuíam baixa capacidade aeróbia, associados a uma dieta rica em CHO simples, foram mais susceptíveis a DHGNA. Este mecanismo pode ser compreendido, pois as alterações no metabolismo oxidativo, podem gerar disfunções mitocondriais, causando déficit energético e consequente incremento no armazenamento de gorduras no fígado. [17]

O exercício aeróbio é caracterizado por apresentar baixos padrões de intensidade (40-50%) do volume de oxigênio máximo (VO_2 Max), precedido de uma maior duração da atividade. Utiliza-se da oxidação lipídica com substrato para fornecimento energético, durante o exercício físico [18]. Além disso, benefícios, são encontrados na biogênese mitocondrial, ocasionado pelo aumento no número de mitocôndrias, funcionalidade, e reduzindo danos causados pela produção excessiva de EROS [19]. Thyfault e colaboradores [20], em modelo experimental com ratos, demonstraram que ter baixa capacidade oxidativa mitocondrial garante suscetibilidade a DHGNA, por proporcionar, dentre outras coisas, um maior fenótipo lipogênico no organismo.

Rector e colaboradores [21] demonstraram que regular a prática de atividade física aeróbia em intensidade de 85% do volume de oxigênio máximo durante 12 semanas foi capaz de reduzir níveis de triglicerídeos intra-hepáticos e melhorar a sensibilidade e resistência à insulina, sem proporcionar perda de peso significativa. Entretanto, quando a atividade física proporciona perda de peso em níveis significantes, os benefícios são

duplamente potencializados. No entanto, o estudo dá ênfase a limitações ligadas à adesão a prática de exercício regular em estudos com seres humanos.

Quando analisada a relação entre pacientes com EHNA e funcionalidade mitocondrial, Carreras e colaboradores [22,23] analisaram a atividade dos cinco complexos da cadeia transportadora de elétrons. Em seus resultados encontrou-se que estes pacientes, quando comparados ao grupo controle, possuíam redução na atividade cinco nos complexos mitocondriais, resultando em déficit energético, resposta inflamatória e lipogênese.

Em contra partida, Gonçalves e colaboradores [24] demonstraram que a atividade física pode prevenir disfunções mitocondriais, por meio da modulação no metabolismo oxidativo e bioenergético. Este mecanismo consiste no aumento da atividade intramuscular e hepática de adenosina mono fosfato kinase (AMPK), que realiza a inibição de fatores associados a lipogênese, dentre os quais destaca-se: Regulador do transporte de esterol (SREBP1C) e de síntese de ácidos graxos (FAS), levando a diminuição da resposta inflamatória, estresse oxidativo e danos mitocondriais. Entretanto, não está claro de que forma o exercício físico atua modulando a biogênese mitocondrial e descompensação energética.

Figura 1: Efeitos do sedentarismo e baixa capacidade aeróbia, na progressão de processos fisiopatológicos da DHGNA.

1.3 DHGNA, Estresse Oxidativo e Exercício Físico

Dentro da fisiopatologia característica encontrada na doença hepática gordurosa não alcoólica, o estresse oxidativo (EO) destaca-se como um dos fatores que contribuem para progressão do estadiamento clínico de seus pacientes [25]. O EO se caracteriza pela superprodução de EROS, associado com desequilíbrio e diminuição nos níveis de enzimas antioxidantes responsáveis por retirar estes compostos do ambiente celular. Dentre as substâncias que são produzidas destaca-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), esta substância no meio intracelular causa ativação macrofágica, que por sua vez expressa citocina pró-inflamatória, além disso o desequilíbrio metabólico proporciona

sobrecarga funcional nas mitocôndrias, que a longo prazo ocasiona mitofagia, processo de degradação das mitocôndrias e subsequente autólise desta organela [26].

As defesas antioxidantes são responsáveis pela regulação e eliminação de EROS nos tecidos corpóreos, em estado de homeostase corporal há um equilíbrio entre estes dois componentes fisiológicos. Estes compostos ativos são encontrados sob duas formas: as enzimas antioxidantes de prevenção, que atuam de maneira profilática, evitando com que ocorra desequilíbrio dentro dos processos de oxirredução, dentre elas estão: CAT e GPx; e outro tipo enzimático, os antioxidantes de clivagem de cadeia, que atuam durante a execução do processo de produção do EO, tentando trazer os processos redox a sua devida normalidade [27,28].

Trazendo para o cenário da fisiopatologia da DHGNA, o processo de peroxidação lipídica aparece como fator determinante para produção de EROS, uma vez que o fígado deixa de oxidar lipídeos (reações exotérmicas fisiológicas mediadas pelo oxigênio molecular, que tem como produto final a produção de água (H_2O) e gás carbônico (CO_2) e passa a peroxidar lipídeos (reações mediadas pelo consumo de oxigênio molecular) [29]. Esta produção excessiva de ânions superóxidos e peróxidos causam danos celulares e moleculares, uma vez que quando ativados estes peróxidos estimulam a produção citocinas pró-inflamatórias, lipotoxicidade, distúrbios metabólicos e redução à capacidade funcional das mitocôndrias e danos em seu ácido desoxirribonucleico (*DNAmt*), estes fatores contribuem para a progressão da DHGNA [30].

Figura 2: Mecanismo de produção de espécies reativas de oxigênio e excesso de ácidos graxos livres dentro hepatócito e suas consequências fisiopatológicas dentro da DHGNA

Fonte: Ana Rolo et al, 2012 (Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis, 10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.003)

Em relação à fibrogênese hepática, o EROS também desempenha papel fundamental na ativação e síntese de células esteladas hepáticas, elementos celulares que, em estado fisiológico, estão quiescentes dentro dos hepatócitos [31]. Uma vez que há o aumento na produção e sinalização celular de fatores inflamatórios sintetizados pela lipogênese intra-hepática e EROS como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator nuclear Kappa B (NFKB), células de Kupper e infiltração de neutrófilos, estas células esteladas passam a expressar proteínas ligadas a matriz extracelular dos hepatócitos e iniciam a produção de colágeno acarretando os variados graus de fibrose [32,33,34].

Em contrapartida, o exercício físico aparece como fator de regulação deste processo, uma vez que ele é responsável pelo aumento na produção de enzimas antioxidantes e possui resposta positiva na inflamação, aumentando a produção de citocinas anti-inflamatórias em intensidade moderada [35]. Souza e colaboradores [36], em um estudo de revisão demonstraram que a prática regular de exercícios físicos aeróbios não extenuantes (aqueles que não proporcionam um grau de fadiga muscular excessiva), é capaz de regular o estresse oxidativo, aumentar ativação muscular e

proporcionar maior biogênese mitocondrial. Este estudo, demonstra que há necessidade de se estabelecer uma zona alvo em relação a intensidade, frequência e duração do exercício físico para pacientes para DHGNA, para que se possa maximizar os resultados e evitar possíveis evoluções negativas no estadiamento clínico destes indivíduos, além de melhorar a adesão a programas de exercício físico e mudança de estilo de vida.

Figura 3: Lacunas e dificuldades encontradas na literatura em relação a prática de exercício físico dentro da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

1.4 DHGNA, Biogênese Mitocondrial e Exercício Físico

Dentro da gama de organelas existentes em nossas células, a mitocôndria destaca-se por possuir múltipla funcionalidade, dentre as quais podemos citar: produção energética, atividade metabólica, respiração intracelular fundamentais para manutenção da homeostase celular. Além disso, possui o seu próprio material genético (DNAm) responsável pela transcrição gênica e tradução de proteínas específicas [37]. A mitocôndria possui morfologia arredondada ou alongada, com duas membranas lipoproteicas: interna e externa, responsáveis pelo transporte de enzimas, íons e substratos como CO_2 , estas proteínas transportadoras especializadas que se denominam: translocases. Em adição, entre estas membranas existe um espaço denominado de intermembranar dotado de enzimas metabolicamente ativas que estimulam de processos ligados ao metabolismo celular [38]. Contudo, o que faz da mitocôndria um componente celular indispensável e fundamental é a sua capacidade de produção de adenosina

trifosfato (ATP), esta “moeda” energética é responsável pelo fornecimento de energia ao nosso organismo, e pode ser obtida por três reações óxido redutoras, sendo estas: (1) glicólise, que consiste na catálise de glicose em ácido pirúvico que, por sua vez, origina o piruvato. Este reage com o acetil-coenzima A (acetil-CoA), e entra na membrana mitocondrial interna por translocação, dando início ao (2) ciclo de Krebs ou dos ácidos tricarboxílicos. O saldo energético e eletrônico do ciclo é encaminhado para a (3) cadeia transportadora de elétrons (CTE), que possui cinco complexos multienzimáticos responsáveis pela captação de elétrons e conversão em um saldo de 36-38 ATP's [39].

No músculo esquelético as mitocôndrias estão ligadas na especialização de fibras musculares do tipo um (fibras de contração lenta), que possui predominância de utilização de via metabólica oxidativa. Uma vez que se estabelece o estado de inatividade muscular esquelética ou desuso muscular, o conteúdo mitocondrial (morfo funcionalidade mitocondrial) é modificado, de modo que os níveis de transcrição do co-ativador de proliferação peroxissomal alfa (PGC-1 α) reduzem de forma significativa [39]. Este por sua vez é o principal indicador do processo de biogênese mitocondrial que se caracteriza pela produção de novas mitocôndrias e que, de forma concomitante, proporcionam incrementos significativos nos níveis de oxigênio molecular e na aptidão aeróbia [40].

O PGC-1 α , está ligado à via de ativação muscular através da sua interação na taxa de ATP/adenosina monofosfato (AMP), que por sua vez está relacionado à expressão de adenosina monofosfato quinase (AMPK). Esta proteína, quando ativada pela contração muscular por vias aeróbias, realiza a fosforilação e transcrição do PGC-1 α , este interage com fatores nucleares respiratórios 1 e 2 (NRF-1 e NRF-2), para o transporte do DNA e estimulação da biogênese mitocondrial [41].

Figura 4: Mecanismo de estimulação da biogênese mitocondrial via AMPK/PGC-1 α .

Quando o organismo é estimulado pelo exercício físico aeróbio produz diferentes respostas orgânicas, dentre elas, o aumento da capacidade aeróbia ou aptidão aeróbia, que conceitualmente está relacionada a um maior nível de oxigênio molecular captado e realização de atividade com o menor dispêndio energético, o que caracteriza a eficiência metabólica [42].

Ferreira e colaboradores [43] realizaram um protocolo de avaliação do nível de lactato máximo produzido no sangue, lactato estável e níveis de lactato frente a uma carga de esforço (*workload*) de 60% da velocidade de corrida dos animais, para isso foram utilizados 32 camundongos C57BL/6J, que foram divididos em dois grupos (treinado n=15 e sedentário n=17). Os resultados encontrados mostraram que o grupo que praticou treinamento físico, produziu um maior nível de velocidade produzida, além de níveis maiores de lactato em resposta ao esforço, associado a esses resultados houve uma resposta de bradicardia nestes animais em 21% em relação ao grupo sedentário. Isto demonstra que o exercício físico aeróbio foi capaz de produzir adaptações significantes no sistema cardiovascular.

Este estudo foi fundamental, pois serviu como padronização deste protocolo para camundongos desta linhagem, se mostrando reprodutivo, após análise cega entre os

pesquisadores. Outro estudo com exercício físico aeróbio por *Rector* e colaboradores [44], realizou uma comparação entre grupos de camundongos C57BL/6J, que foram divididos por nível de capacidade respiratória em: alta capacidade respiratória (*high capacity respiratory-HCR*) e baixa capacidade respiratória (*Low capacity respiratory-LCR*). Os resultados demonstraram que o grupo HCR possuiu menor nível de triglicerídeos intra-hepáticos, precedido de maiores níveis de citocromo c, citrato sintase e β -hidroxiacetil-co-A desidrogenase (β -had) intra-hepática.

Isso demonstra que camundongos que praticaram exercício físico aeróbio possuíam melhor funcionalidade mitocondrial, repercutindo em melhora dos níveis de DHGNA, comprovados por análise histológica e por menores níveis de SREBP1C encontrados no grupo HCR. Outro resultado importante foi encontrado na avaliação da área de fibrogênese e apoptose nuclear de hepatócitos intergrupo, o grupo HCR teve menor área fibrosada e menor nível de apoptose nuclear de hepatócitos [44].

Figura 5: Modificações celulares causadas pela EHNA em *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats*; em comparação com o grupo saudável.

Fonte: Retirado de *Mitochondria and Redox Signaling in Steatohepatitis*, Morris et al, 2011

Por isso, fica evidente que camundongos com DHGNA, que possuíam baixo nível de aptidão cardiorrespiratória, estão mais susceptíveis a distúrbios energéticos severos capazes de proporcionar uma taxa maior de evolução clínica e fisiopatológica. Por outro lado, a prática regular de exercício físico aeróbico é capaz de proporcionar estímulos e adaptações no sistema cardiorrespiratório, sendo capaz de produzir um maior nível de oxigênio molecular por biogênese mitocondrial. Entretanto os mecanismos que geram tais benefícios ainda permanecem desconhecidos em sua totalidade.

Dentro da instalação multifatorial da DHGNA, Perfield [45], realizou um estudo com camundongos C57BL/6J em dois subtipos desta linhagem: Selvagem ou *Wild-Type* (WT) e *Ob Ob* com deficiência no hormônio leptina, a fim de comparar em qual dos grupos de animais haveria maior alteração no metabolismo de fatores lipogênicos, assim como maior deposição histológica de lipídeos, fatores pró-inflamatórios e se isso estava associado a disfunções de genes relacionados a biogênese mitocondrial e ao conteúdo de enzimas associadas com os cinco complexos da CTE. Os resultados demonstraram que os animais WT apresentavam uma magnitude menor no nível de expressão gênica de fatores lipogênicos como: SREBP1C, fator de proliferação peroxissomal ativação do receptor γ (PPAR- γ), acetil co-A carboxilase (ACC), dentre outros, em relação ao grupo *Ob Ob*.

Na análise realizada sobre a disfunção mitocondrial, foi encontrado que os animais *ob ob* obtiveram um maior nível de expressão de genes ligados à biogênese mitocondrial (PGC-1 α , CPT-1, fator de transcrição mitocondrial α (TFAM), entretanto no conteúdo das proteínas e enzimas ligadas a funcionalidade (β -had) e aos complexos mitocondriais I, III e V, houve diminuição destas enzimas. Isto demonstra que a DHGNA é uma condição patológica associativa entre alterações lipídicas, inflamatórias e mitocondriais [45]. Por sua vez se faz necessário o entendimento sobre os mecanismos pelos quais o treinamento físico é capaz de modular a fisiopatologia da DHGNA, e como isso gera um real impacto sobre a condição clínica e qualidade de vida nestes pacientes.

1.5 Modelo experimental, exercício físico e dhgna

Estudos em modelo experimental aparecem como alternativa para mimetizar a relação exercício físico e DHGNA, pois apresentam a possibilidade de controle de variáveis fisiológicas e ambientais. Entretanto possuem fragilidades por, muitas vezes, não poderem ser fidedignos e replicativos, em modelos humanos.

O modelo com camundongos obesos (*ob/ob*) foi descoberto em 1949 numa colônia em Roscoe B. *Jackson Memorial Laboratory*, na cidade de *Bar Harbor*, localizado no estado de Maine, EUA, se caracteriza, por um consumo excessivo de nutrientes e sua consequente deficiência à leptina, que por sua vez, atua nesses animais na determinação do fenótipo da obesidade, hiperglicemia e hiperinsulinemia [73,74]. Estes camundongos são utilizados em modelos para diversos tipos de estudo com doenças e condições fisiopatológicas como: diabetes, obesidade, resposta inflamatória e resistência à insulina.

No período pós-gestacional, estes animais possuem características morfológicas semelhantes aos camundongos eutróficos, entretanto, em torno de 2 semanas, fenômenos como hiperinsulinemia e aumento excessivo no peso, são potencializados, modificando completamente a estrutura de sua composição corporal. Tais mudanças se tornam mais expressivas após o desmame, demonstrando uma hiperglicemia, de forma mais evidente, a partir da quarta semana de vida. Há um aumento da glicose sanguínea ao longo do tempo, atingindo seu pico entre 3 a 5 meses, devido ao seu crescimento e alta oferta e ingestão alimentar [75,76]. No entanto, à medida que vão envelhecendo, estes valores diminuem e eventualmente, passam a estabelecer valores perto da normalidade [77].

A condição metabólica dos camundongos ob/ob provocam uma redistribuição no armazenamento de gordura corporal, hepática e de outros tecidos não-adiposos. Este aumento da captação de lipídios induz ao dano e apoptose celular. Estudos com exercício físico neste modelo são escassos pela condição de hipocinesia encontrada nesses animais, contudo, Haczeyni e colaboradores [77] demonstraram que o exercício físico aeróbico realizado na roda, obteve um efeito metabólico protetivo, aumento da fosforilação de proteína kinase B (AKT) em nível muscular, além oferecer efeito preventivo sobre a resposta inflamatória, obesidade e diabetes em ratos obesos *foz/foz*. Outro achado importante deste estudo encontra-se na modulação realizada pelo exercício físico aeróbico sobre a morfometria de adipócitos, tal fenômeno diminui o tamanho destas células do tecido adiposo, sua hipertrofia e conteúdo gorduroso.

1.6 Justificativa

De acordo com a relevância e impacto da doença hepática gordurosa não alcoólica, nos parâmetros epidemiológicos, clínicos e fisiopatológicos e considerando o seu potencial de cronificação para estágios patológicos mais severos como a cirrose hepática e CHC, deve-se avaliar os diversos efeitos e mecanismos proporcionados por uma intervenção com treinamento físico em oito semanas em camundongos obesos, com finalidade de elucidar seu papel como terapêutica não farmacológica de primeira linha na prevenção e tratamento da DHGNA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Avaliar o efeito do treinamento físico sobre metabolismo oxidativo, funcionalidade mitocondrial (PGC1 α , CPT1 α e PPAR- α) e lipogênese (SREBP1) hepática e muscular em modelo de DHGNA em camundongos obesos (*ob/ob*).

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o efeito do treinamento físico sobre o metabolismo oxidativo (MDA, Carbonilas, SOD, CAT, GST, Sulfidrilas, GSH, GSH/GSSG, Citrato Sintase, β -HAD);
- ✓ Avaliar a histologia hepática em camundongos obesos (*ob/ob*) após o protocolo de treinamento físico de oito semanas;
- ✓ Avaliar o consumo alimentar e peso corporal dos camundongos *ob/ob*, durante o procedimento metodológico;
- ✓ Avaliar o comportamento de variáveis ligadas ao Treinamento Físico (distância percorrida, velocidade pico e duração)

2.3 Hipóteses de Pesquisa

- ✓ (H0) O treinamento físico aeróbio em oito semanas não será eficiente no controle da lipogênese hepática, estresse oxidativo e biogênese mitocondrial hepática e muscular.
- ✓ (H1) O treinamento físico aeróbio em oito semanas será eficiente no controle da lipogênese hepática, estresse oxidativo e biogênese mitocondrial hepática e muscular.

3. METÓDOS

3.1 Delineamento e Local do Estudo

O estudo possui delineamento experimental e foi desenvolvido parte no Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental (LIM-07) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), e parte no Laboratório de Biomedicina da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da USP (EACH-USP). A análise histopatológica dos fragmentos foi realizada no Departamento de Patologia da Faculdade de Veterinária da Universidade de São Paulo por um único patologista.

3.2 Procedimentos experimentais e delineamento do estudo

Esse estudo seguiu as orientações recomendadas pela Declaração de Helsinki de 1975 [publicada por "US National Institute of Health-Guide *for care and use of laboratory animals*" (NIH Publication, nº 85-23, revisada em 1996)] e do Serviço de Experimentação em animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Estudo encontra-se aprovado e registrado com número 040/17, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pelo CEUA da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 05.04.17

Foram utilizados camundongos ob/ob, machos, provenientes do Biotério do Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimentais (LIM-07) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Os animais foram mantidos durante o protocolo experimental no Biotério da EACH-USP, em local com temperatura, umidade e ventilação controlada, com ciclos de luz / escuro de 12 horas, com ração e água *ad libidum*. Os animais com seis semanas de vida foram distribuídos de forma aleatória em dois grupos: sedentário (SED = 7) e treinado (TF n=7). Após período de oito semanas de treinamento físico, os animais foram anestesiados utilizando-se cloridrato de Ketamina (0,1mL/ Kg)/ Xylasina (10 mg/Kg), intraperitoneal. As mostras de tecido hepático e músculo esquelético foram coletadas para avaliação histológica, avaliação do estresse oxidativo, biogênese mitocondrial e análise do conteúdo de RNAm dos genes citados nos objetivos. Após o procedimento de eutanásia, as carcaças dos animais foram enviadas ao setor de incineração conforme as normas da FMUSP.

Figura 6. Fluxograma da distribuição dos grupos experimentais em sedentário e treinamento físico.

3.3 Protocolo de Treinamento Físico

O protocolo de treinamento físico foi realizado em esteira rolante, 5 vezes por semana, durante 8 semanas. As sessões de treinamento tiveram intensidade de 60% do resultado do teste de esforço realizado pelos animais do grupo treinamento físico, sendo progressivamente aumentada, iniciando com 30 minutos na primeira semana e atingindo 60 minutos na quarta semana, conforme descrito por Ferreira et al. [43]. Essa duração de treinamento foi mantida até o término do protocolo de treinamento físico. Os camundongos sedentários foram submetidos à caminhada na esteira, uma vez por semana, durante 10 minutos. Esse procedimento se fez necessário para evitar qualquer interferência do estresse gerado pela esteira. Este modelo, por apresentar obesidade proveniente da deficiência em leptina, tende a se tornar cada vez mais hipocinético. Entretanto no presente estudo não houve nenhuma exclusão de animais ou incidente durante a execução do protocolo de treinamento físico. Os camundongos realizaram todas as sessões do presente protocolo.

Figura 7 e 8: Esteira Inbramed modelo KT 10200, Brasil adaptada para realização do treinamento físico em oito semanas com camundongos ob ob.

3.4 Teste de esforço físico máximo

A capacidade máxima de execução de exercício físico foi avaliada antes, na semana quatro, e após o treinamento físico através de um teste progressivo até a exaustão em esteira rolante. Foram quantificados o tempo máximo de execução do teste, a velocidade atingida no pico do exercício e a distância total percorrida em metros. A velocidade inicial da esteira será de dois km/h sem haver inclinação da mesma. A cada três minutos, a velocidade da esteira foi aumentada em 0,2 km/h até atingir a exaustão do animal.

O teste foi encerrado quando o camundongo entrou em fadiga, ou seja, não conseguiu manter o padrão da corrida. Na quarta semana foi realizado o teste somente no grupo treinado para reajuste da intensidade do treinamento físico. Na oitava semana foi realizado o teste de capacidade de corrida em ambos os grupos, para visualização do comportamento das variáveis ligadas ao treinamento físico: distância percorrida, tempo de execução do teste e velocidade pico. Estes indicadores demonstram que houve adaptação e efeito do treinamento físico após a intervenção de oito semanas.

3.5 Avaliações metabólicas

Ao longo de todo protocolo experimental, a pesagem corporal foi realizada semanalmente em balança digital (Gehaka/modelo BG4001, São Paulo, Brasil) no mesmo dia e horário. Além da evolução do peso corporal, foi calculado o ganho de peso corporal através da diferença entre o peso corporal final (semana 8) e o peso corporal inicial (semana pré-treinamento). O consumo de ração foi avaliado em grupos de animais mantidos na mesma gaiola ao longo de todo protocolo experimental, durante períodos de 24 horas, por quatro dias consecutivos de cada semana. Utilizamos a média dos quatro dias avaliados para determinar o consumo de ração semanal.

3.6 Procedimento de Eutanásia

Ao término das oito semanas de treinamento físico, os animais treinados e sedentários foram transportados para o biotério do laboratório de Gastroenterologia clínica e experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Após 48 horas da última sessão de treinamento e 8 horas de jejum realizados em ambos os grupos de animais, foi aplicado o cloridrato de Ketamina, 0,1mL/ Kg, Xylasina, 10 mg/Kg, cuja aplicação foi intraperitoneal e retirou-se os materiais biológicos (fígado, músculo esquelético sóleo e gastrocnêmico de ambas as patas). Além disso apenas para pesagem foram retirados os tecidos adiposos retroperitoneal, periepididimal e inguinal. Depois de todos os procedimentos as carcaças dos animais foram encaminhadas para incineração. O material foi estocado em um freezer em -80 C⁰ graus célsius.

3.7 Avaliação Histológica

Fragmentos de tecido hepático foram fixados em formol salino a 4% e submetidos a colorações hematoxilina-eosina (HE), segundo a rotina adotada na divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP.

Fragmentos de tecido hepático previamente fixado em solução de formol a 4% foram processados e submetidos às colorações de hematoxilina-eosina (HE). As amostras de fígado foram avaliadas de maneira cega por um patologista hepático experiente utilizando um sistema modificado da classificação padronizada por Liang e colaboradores [46], conforme demonstrado no quadro abaixo. As variáveis histológicas estudadas para serem classificadas em um escore :esteatose macrovesicular (0-3), esteatose microvesicular (0-3), hipertrofia de hepatócitos (0-3) e focos inflamatórios (0-3). Este escore foi desenvolvido especificamente para roedores e descrito por Liang [63].

3.8 Expressão Gênica

3.9 Extração do RNA Tecidual

O material recebido em nitrogênio líquido foi fragmentado em pulverizador de tecidos (*Mikro-Dismembrenator II B. Braun. Melsugen, RFA*). Após a pulverização, foram adicionados 1,0 mL de Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e essa mistura foi incubada por 5 min à temperatura ambiente. À solução foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck), e agitada vigorosamente por 15 s, seguido de incubação por 5 min à temperatura ambiente e centrifugada durante 15 min, 12.000 RPM, a 4 graus Celsius (*Eppendorf 5417-R, Hamburg, Alemanha*). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril de 1,5 µL e o RNA foi precipitado com 500 µL de isopropanol (Merck). A mistura foi deixada em repouso durante 10 min e centrifugada por 15 min, 12.000 RPM, a 4 graus Celsius. O sobrenadante foi removido e o botão de RNA lavado com 1,0 mL de etanol (Merck) 70%, centrifugado novamente e ressuspenso em um volume apropriado de água estéril [ULTRAPURE™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)]

3.10 Quantificação e Análise da Integridade do RNA Total

A concentração dos RNA's totais extraídos foi determinada por espectrofotometria [NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)]. A preparação do RNA foi considerada livre de proteínas quando a relação A260/280 encontrar-se entre 1,8 e 2,0. Para as amostras que não atingem estes valores, foram realizadas purificações utilizando-se o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). A integridade e a pureza dos RNAs foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Somente foram utilizadas as amostras cujas bandas correspondentes ao RNA ribossomal 18 e 28 s mostraram-se íntegras à análise sob luz ultravioleta. Os RNA's foram mantidos a -80 °C até sua utilização.

Figura 9: Análise da Integridade do RNA total por eletroforese com agarose a 1%

3.11 Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa Quantitativa Relativa (RT-qPCR)

As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Sidney, Austrália), utilizando-se o conjunto de reagentes Superscript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), conforme recomendação do fabricante. A intensidade de expressão de cada gene foi obtida pelo valor de limiar do ciclo, no qual o aumento no sinal associado à fase exponencial de amplificação do fragmento começa a ser detectada. A reação para cada gene analisado foi cuidadosamente padronizada com a finalidade de evitar qualquer amplificação inespecífica. A temperatura de anelamento para a amplificação de todos os genes foi 60 graus Celsius. Todas as reações de RT-q PCR foram realizadas em duplicata para cada amostra de tecido hepático e muscular, tanto para o gene alvo quanto para o controle.

Os oligonucleotídeos para os genes do PGC-1 A, CPT1, SREBP1C e PPAR- α , foram desenhados no programa Primer3 Input (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Foi utilizado o gene β -actina como controle endógeno.

3.12 Sequência de Oligonucleótidos para Expressão Gênica

Tabela 1: Sequência de Oligonucleótidos sintetizados:

Genes	Sequência
SREBP1	F: GCG CTA CCG GTC TTC TAT CA R: GGA TGT AGT CGA TGG CCT TG
PPAR- α	F: ATG CCA GTA CTG CCG TTT TC R: TTG CCC AGA GAT TTG AGG TC
CPT-1 α	F: TGC CTC TAT GTG GTG TCC AA R: TCA AAC AGT TCC ACC TGC TG
PGC-1 α	F: CTA CAG ACA CCG CAC ACA TCGC R: GGA TGT AGT CGA TGG CCT TG
β -Actina	F: TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA R: GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA

F: forward; R: reverse

3.13 Método de Análise da expressão Gênica

Para análise dos níveis de expressão gênica foi realizado o cálculo de quantidade relativa por $-2 \Delta\Delta C_t$, segundo apresenta Rao e colaboradores [75]. Este método foi desenvolvido para analisar os padrões de expressão gênica baseados na análise espectrofotométrica obtida no experimento de RT-PCR .

3.14 Atividade enzimática, biomarcadores e complexo não enzimáticos ligados ao estresse oxidativo

A avaliação da capacidade e estresse oxidativo no fígado foi realizada através da dosagem das enzimas citrato sintase, β -hidroxiacetyl-co-A desidrogenase, superóxido dismutase, catalase, malaldeído, carbonilas, sulfídrilas, β -hidroxiacetyl-co-A desidrogenase. Além disso elementos do complexo não enzimático relacionadas ao estado redox: glutathione S transferase, glutathione reduzida e glutathione oxidada em animais submetidos ao treinamento físico por oito semanas.

3.15 Citrato Sintase

A citrato sintase é uma enzima do ciclo de Krebs, e possui importância fundamental na catalisação e condensação do acetyl CoA que se associa ao oxalacetato

para formação do citrato, primeiro produto do ciclo de Krebs. Além disso, tal enzima é um indicativo de treinabilidade do exercício aeróbio. Para a avaliação dos níveis de citrato sintase no fígado, a reação foi realizada através de uma mistura que continha em (mM): 100 Tris-HCl (pH.8.2), 1 cloreto de magnésio ($MgCl_2$), ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), 0,2 5,5-dithio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) ($E= 13.6 \mu\text{mol}/(\text{mL}.\text{cm}^{-1})$), 3 acetil CoA, 5 oxalacetato e 0,3 mg/mL de tecido hepático homogeneizado. A atividade enzimática foi avaliada através da mudança na taxa de absorbância a 412 nm durante 3 minutos de intervalo a temperatura de 25° C [65]

3.16 Atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade de SOD foi determinada em acordância com Misra and Fridovich (1972) [66]. Desta forma foram utilizadas 300 μg de proteína com adição de 0.05 M de tampão de carbonato com Mm-EDTA (Ph 10,2). A reação foi iniciada com a adição de 150 Mm de adrenalina ou epinefrina e a atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da epinefrina a 30° C. A diminuição da absorbância foi acompanhada por 1.5 minutos a 480nm e o fator de extinção da adrenalina foi usado para expressar em U/mg de proteína.

3.17 Catalase

A atividade da catalase é um componente enzimático que possui efeito anti-oxidante e foi realizada e descrita previamente por Aebi (1984) [67]. Onde se utilizou 300 μg do sobrenadante de proteína, com a adição de 50mM do tampão fosfato (pH.7.0) e 0.3 M-de peróxido de hidrogênio e sua devida oxidação. Foi acompanhada toda cinética enzimática (padrão de curva) a 240nm por 3 minutos a 20° C, com seu resultado expresso em U/mg de proteína.

3.18 Malonaldeído (MDA)

No presente estudo também foi avaliada a peroxidação lipídica através da atividade da enzima MDA. Foram utilizadas 300 μg e 50 μg de proteína que foram misturadas para 30% (w/v) de ácido tricloroacético e 10 mM de tampão TRIS (pH 7.4) em volumes iguais e agitados. Essa mistura foi centrifugada em volumes iguais a 0,73% (w/v), além disso, foi adicionado ácido tiobarbitúrico, em sequência foi fervido a 100° C por 15 minutos. A MDA reage com as devidas substâncias que participam da reação formando um pigmento rosa com absorção máxima a 535 nm. Os níveis de MDA foram expressos em nmol/ mg de proteína. [68]

3.19 Carbonilas

Para avaliação da oxidação de proteínas foram avaliadas as enzimas carbonilas usando os procedimentos destacados por Reznick e Packer (1994) [69]. Com as amostras em gelo, 30% (p / v) de TCA foi adicionado à amostra e depois centrifugado por 14 min a 4.000 RPM. O pellet foi ressuspenso em 10 mM de 2,4-dinitrofenilhidrazina e imediatamente incubada em um quarto escuro por 1h com agitação a cada 15min. As amostras foram lavadas e centrifugadas três vezes em tampão de acetato/etil e, ao final do dos procedimentos, o pellet foi ressuspendido em 6M hidrocloreto incubado por 30 min a 37°C e a absorbância foi lida a 370nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína [69].

3.20 Sulfidrilas

Foi avaliado também grupamento sulfidrilas totais, estas enzimas são responsáveis por ativação da resposta anti-oxidante. O experimento se desenvolveu da seguinte forma: dissolveu-se 39,6 mg de 5,5 ditiolbis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) em 10 ml de fosfato ($\mu=0.1$) tampão (pH 7.0). O reagente (0.02 ml) foi adicionado para 3.0 ml desta mistura. Esta mistura desenvolve coloração rapidamente em cerca de 2 minutos e a absorbância foi medida em 412 nm [70].

3.21 Glutathione S Transferase (GST)

A atividade deste componente do complexo não enzimático GST foi avaliada da seguinte maneira: 200 μg de proteína foi adicionada para 0,1 M de tampão fosfato (pH 6.5), contendo 1mM de EDTA. Para essa solução, foi adicionado 60 mM de glutathione peroxidase e 30 mM de 1-cloro-4,4-dinitrobenzeno para que se pudesse iniciar a reação. O padrão de absorbância para este componente foi de 340 nm, foi observado durante 1 minuto para detectar a formação do 2,4-dinitrofenol-S-Glutathione (DNP-SG). A unidade de exposição deste componente biológico foi definida através da formação de 1 μmol de DNP-SG [71].

3.22 Estado redox via Glutathione reduzida (GSH) e Glutathione oxidada (GSSG)

Analizamos inicialmente cada composto da glutathione isoladamente. Para avaliar os níveis de GSH, as amostras foram diluídas 10 vezes em tampão fosfato 0,1 M contendo 5 mM-EDTA (pH 8,0). Então, realizamos uma alíquota da amostra diluída que foi incubada com 1 mg / ml de o-ftaldialdeído (OPT) à temperatura ambiente por 15 minutos e, após isto, as intensidades de fluorescência avaliadas em 350 excitação e 420 nm de

emissão. Para determinar os níveis de GSSG, as amostras foram incubadas com 0,04 M de N-etilmaleimido durante 30 minutos em RT seguido por adição de tampão de NaOH a 0,1 M. Uma vez que esta mistura foi preparada, alíquotas de amostra foram incubados com OPT e tiveram sua fluorescência avaliada usando os mesmos parâmetros do GSH. Ambas as análises foram comparadas a uma curva padrão com concentrações conhecidas de GSH e GSSG e Estado Redox determinado pela razão de GSH / GSSG [72]

3.23 β -hidroxiacetil-co-a desidrogenasse

O fígado foi homogeneizado numa solução contendo (em mM) 20 Tris.HCl (pH 7,4 a 4 ° C), 50 NaCl, 50 NaF, 5 Na pirofosfato, 0,25 sacarose e 1 ditioneitol, com coquetel inibidor de protease (Sigma) e cocktail inibidor da fosfatase (Sigma). Após homogeneização durante 30s, os conteúdos de proteína dos homogenatos foram determinados com o ensaio de proteína de Bradford. Para a actividade de β -HAD, incubaram-se 15 μ g de proteína numa mistura reaccional contendo (em mM) 50 imidazole (pH 7,4), 0,15 NADH e 0,1 acetoacetil-CoA (omitido para o controlo). A actividade de β -HAD foi medida a 340 nm seguindo o desaparecimento de NADH (ϵ 6,22 μ mol $\cdot$ ml⁻¹ $\cdot$ cm⁻¹) ao longo de 5 min (intervalos de 30 segundos) [73].

3.24 Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média ou mediana (dependendo do padrão de distribuição das variáveis na análise exploratória dos dados através do teste de D'Agostino com ajuste Gaussiano de Pearson). Foram colocados valores Mínimos (Min), Máximos (Max) e de Erro Padrão da Média (EPM).

Para variáveis de distribuição Gaussiana foram utilizados o teste t. Para variáveis de distribuição não-Gaussiana foram utilizados os testes de Mann Whitney. Para comparação dos escores histológicos entre os grupos foram utilizados o teste de chi-quadrado (X^2). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Todos os cálculos foram realizados no *GraphPad Prism V6.0 (GraphPad Software Inc)*.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização amostral

O presente estudo foi composto por 14 camundongos obesos (*Ob Ob*) isogênicos com deficiência em leptina, com idade de seis semanas de vida obtidos do biotério de Experimentação Animal do laboratório de Gastreenterologia clínica e experimental (LIM07). Após a chegada ao Biotério da EACH-USP os animais foram pesados e aclimatados, após a aclimação foram submetidos ao procedimento de monitoramento por microchip utilizando o aparelho modelo animal TAG silvestre, para realização deste processo foi utilizado um anestésico Isoflurano (1ml/mL) administrado de forma inalatória.

Tabela 2: Medida inicial do peso corporal dos animais, antes do início do protocolo de treinamento físico.

Grupo Experimental	N*	Média do Peso Corporal (g)	Erro Padrão da Média
Sedentário	7	33,76	0,86
Treinado	7	32,80	0,63
*Número de Animais por Grupo			

Em relação ao peso corporal, medido no momento prévio ao treinamento físico, foi visualizado que o grupo treinado obteve a menor média de peso corporal (Valor+EPM) em relação ao grupo sedentário (Tabela 2).

4.2 Peso Corporal

Foram realizadas três medidas para avaliar a evolução do peso corporal durante as oito semanas de protocolo de treinamento físico. Foi utilizado o teste t para avaliar o ganho de peso corporal médio de cada animal por grupo experimental (Figura 10) e Ganho percentual (%) de peso corporal médio (Figura 11). Além disso, utilizou-se a Anova one way para análise da variância referente à evolução do peso corporal semanalmente intergrupo (Figura 12).

Figura. 10: Ganho de peso médio por animal por grupo experimental:

Foi visualizado que o grupo treinado (N=7) demonstrou um menor ganho de peso corporal médio (Figura 10) após oito semanas de treinamento físico e esta diferença foi significativa com $p=0,0088$, demonstrando que os animais treinados obtiveram um maior controle do peso corporal, mesmo com ambiente obesogênico estabelecido pelo déficit de leptina (LEP).

Figura. 11: Ganho de peso percentual médio por animal por grupo experimental

Além disso, também foi avaliada e comparada a taxa percentual do ganho de peso corporal intergrupos (Figura 11), onde se observou um menor ganho percentual de peso corporal no grupo treinado (n=7) após oito semanas de treinamento físico, e esta diferença foi significativa com $p=0,0372$, corroborando o achado na avaliação do peso corporal médio dos animais, demonstrando uma regulação mais eficaz desta variável.

Figura 12: Evolução da variância do ganho de peso percentual médio por grupo experimental

Subsequentemente foi realizada uma análise variância através do teste *anova one way* com medidas repetidas e *Post Hoc de Bonferroni* (Figura 12) para visualizar a evolução do peso corporal semanalmente, além de demonstrar onde suas possíveis diferenças dentro do protocolo experimental começaram a surgir. Com isso pode se visualizar diferenças significantes na comparação intergrupos com $p=0,0003$ e estas diferenças começam a surgir a partir da terceira semana de intervenção com treinamento físico.

4.3 Consumo de Água e Ração

Durante todo protocolo experimental foram avaliados o consumo de água e ração intergrupo de cada animal, em média, para os camundongos obesos, que foram disponibilizados *ad libidum* aos animais durante todo protocolo experimental. O consumo de água foi obtido por três medidas definidas previamente antes do início das oito semanas de intervenção e foi calculado da seguinte forma: **Quantidade de água adicionada – Quantidade Encontrada/Número de Animais por grupo = consumo médio de água por animal**

Figura 13: Exemplo da realização do consumo médio de água por animal

TREINADO N=3						
Sem 1	29/ago	30/ago	31/ago	01/set	3	
PESO		235	235	230		
ADD	250	250	250		Média	P/animal
CONS		15	15	20	16,67	5,56

Figura 14: Comparação do Consumo Médio de água por grupo experimental após oito semanas de treinamento físico

Para comparação do consumo médio de água por animal de cada grupo (Figura 14) o grupo treinado (n=7) obteve menor consumo de água quando comparado ao grupo sedentário(n=7). Para isso foi utilizado o teste t, que demonstrou diferença estatisticamente significativa intergrupos após oito semanas de treinamento físico com $p=0,0018$, demonstrando maior capacidade de termorregulação hídrica proporcionada pelo treinamento físico nestes animais.

Figura 15: Exemplo da realização do consumo médio de ração por animal

TREINADO N=3						
Sem 1	29/ago	30/ago	31/ago	01/set	3	
PESO		106,67	106,87	110,16		
ADD	125,55	122,26	125,3		Média	P/animal
CONS		18,88	15,39	15,14	16,47	5,49

O consumo de ração foi obtido por três medidas definidas previamente antes do início das oito semanas de intervenção e foi calculado da seguinte forma: **Quantidade de ração adicionada – Quantidade Encontrada/Número de Animais por grupo = consumo médio de ração por animal.**

Figura 16: Comparação do Consumo Médio de ração por grupo experimental após oito semanas de treinamento físico

Para comparação do consumo médio de ração por animal de cada grupo (Figura 16) também foi utilizado o teste t, que demonstrou diferença estatisticamente significativa intergrupos após oito semanas de treinamento físico com $p=0,0010$, onde o grupo treinado ($n=7$) consumiu menos ração do que o grupo sedentário ($n=7$). Este resultado demonstra de forma inferencial que o exercício físico parece causar benefícios sobre o controle de ingestão alimentar destes animais e no seu comportamento hiperfágico comum deste modelo animal.

4.4 Variáveis ligadas ao treinamento físico

Em relação às variáveis ligadas ao treinamento físico aplicado nos camundongos obesos foram avaliadas distância percorrida (Figura 17), duração (Figura 18) e velocidade pico (Figura 19). Todos estes elementos estão ligados ao desempenho físico do animal durante a aplicação do teste de esforço físico realizado em dois momentos do protocolo experimental, no momento pré-intervenção e após oito semanas de treinamento físico, a fim de visualizar o comportamento destas variáveis com a progressão do tempo e do peso corporal destes animais.

Figura 17. Comparação da distância percorrida durante o teste de esforço realizado por grupo experimental em dois momentos do protocolo experimental (pré e pós oito semanas de treinamento físico)

Nesta análise de variância realizada através do teste *Anova one way* com medidas repetidas, foi demonstrado que o grupo treinado (n=7) obteve maior distância percorrida em relação ao grupo sedentário, o que representa uma maior tolerância ao estímulo aplicado pelo exercício físico e a magnitude destas diferenças foi estatisticamente significativa $p=0,0177$ entre os grupos analisados.

Figura 18. Comparação da duração no teste de esforço realizado por grupo experimental em dois momentos do protocolo experimental (pré e pós oito semanas de treinamento físico)

Outra variável analisada foi o tempo de duração do teste de esforço obtido por cada grupo, desta forma foi demonstrado que o grupo treinado (n=7) possuiu um maior nível de resistência durante a execução deste teste em ambos os momentos e *Anova one way com medidas repetidas seguida de Post Hoc de Bonferroni* demonstrou diferenças significativas entre os grupos $p=0,0338$.

Figura 19. Comparação da velocidade pico obtida no teste de esforço realizado por grupo experimental em dois momentos do protocolo experimental (pré e pós oito semanas de treinamento físico)

Em relação à variável velocidade pico que representa um preditor para demonstrar maior adaptabilidade e capacidade aeróbia, foi encontrado que o grupo treinado (n=7) obteve maior produção de velocidade de pico em ambos os momentos do protocolo experimental. Além disso, houve diferença significativa na comparação intergrupos $p=0,0393$ através da Anova one way com medidas repetidas com Post Hoc de Bonferroni.

4.5 Peso Absoluto e Relativo dos Órgãos e Tecidos

Após a eutanásia dos animais, foram obtidos alguns tecidos e órgão para análise do peso absoluto, que se refere ao peso do órgão ou tecido de forma bruta (**sem correção ou ajuste pelo peso corporal ajustado obtido no momento da eutanásia**) e o peso relativo medida que se refere à medida (**peso do órgão ou tecido/peso do animal ajustado x 1000**). Essas avaliações são de suma importância para visualização da distribuição e representatividade numérica destes tecidos e órgão no organismo.

4.6 Peso Absoluto e Relativo do Fígado

Figura 20: Peso absoluto do Fígado após oito semanas de treinamento físico

Em relação ao peso absoluto hepático (Figura.20) foi visualizado que o grupo treinado obteve o menor peso absoluto em relação ao grupo sedentário, com diferença significativa demonstrada através do teste t com $p=0,0465$. Esse resultado representa a atuação do treinamento físico sobre o acúmulo de adiposidade intra-hepática.

Figura 21: Peso relativo do Fígado após oito semanas de treinamento físico

Na análise do peso relativo hepático (Figura 21) o grupo treinado ($n=7$) demonstrou valores médios menores em relação ao sedentário ($n=7$) com significância estatística $p=0,0458$, avaliado pelo teste t.

4.7 Peso Absoluto e Relativo do Tecido Adiposo Retroperitoneal

Figura 22: Peso absoluto do tecido adiposo retroperitoneal após oito semanas de treinamento físico

No peso absoluto do tecido adiposo retroperitoneal (Figura.22) foi demonstrado um maior valor médio no grupo sedentário (n=7) em relação ao grupo treinado (n=7), e esta diferença na comparação entre médias foram significantes com $p=0,0350$ demonstrada através do teste de *Mann-Whitney*. Este resultado representa uma maior interferência do protocolo de treinamento físico sobre a gordura visceral, possuindo desta forma um efeito protetivo contra doenças metabólicas, uma vez que este tipo de gordura possui forte associação na instalação de comorbidades associadas à DHGNA.

Figura 23: Peso relativo do tecido adiposo retroperitoneal após oito semanas de treinamento físico.

No peso relativo do tecido adiposo retroperitoneal (Figura 23) foi demonstrado um menor valor médio no grupo treinado ($n=7$) em relação ao grupo sedentário ($n=7$), o teste de *Mann-Whitney* demonstrou significância estatística $p=0,0484$.

4.8 Peso Absoluto e Relativo do Tecido Adiposo Periepididimal

Figura 24: Peso Absoluto do tecido adiposo periepididimal após oito semanas de treinamento físico.

O peso absoluto do tecido adiposo periepididimal (Figura 24) demonstrou-se levemente menor valor médio no grupo treinado ($n=7$) em relação ao grupo sedentário ($n=7$), entretanto o teste t não demonstrou significância estatística $p=0,8990$.

Figura 25: Peso Relativo do tecido adiposo periepididimal após oito semanas de treinamento físico.

O peso relativo do tecido adiposo periepididimal (Figura 25) foi menor no grupo treinado ($n=7$) em relação ao grupo sedentário ($n=7$), entretanto o teste t não demonstrou significância $p=0,9014$.

4.9 Peso Absoluto e Relativo do Tecido Adiposo Inguinal

Figura 26: Peso Absoluto do tecido adiposo inguinal após oito semanas de treinamento físico.

Na análise realizada através do teste t foi demonstrado que o peso absoluto do tecido adiposo inguinal (Figura 26) foi menor no grupo treinado ($n=7$) em relação ao grupo sedentário ($n=7$) e, entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa com $p=0,3301$.

Figura 27: Peso Relativo do tecido adiposo inguinal após oito semanas de treinamento físico.

Na análise realizada através do teste t demonstrou que o peso relativo do tecido adiposo inguinal (Figura 27) foi menor no grupo treinado (n=7) em relação ao grupo sedentário (n=7) e essa diferença foi estatisticamente significativa com $p=0,0104$.

4.10 Histopatologia Hepática

4.11 Histopatologia Hepática por Hematoxilina e Eosina (HE)

No presente estudo foi realizada a análise histológica, por um patologista experiente, através do método de coloração por HE. Além disso, utilizou-se o escore específico relacionado a avaliação de DHGNA para roedores, descrito por Liang e colaboradores [46]. Este escore está baseado em quatro características histopatológicas: (1) Esteatose macrovesicular, (2) Esteatose microvesicular, (3) Balonização ou hipertrofia de hepatócitos e (4) Focos inflamatórios. Para todas as características foram atribuídos valores que vão de 0-3, onde (0) correspondeu a <5% e (3) a >66% da presença da característica. Foi utilizado o teste de chi-quadrado (X^2) para análise das possíveis diferenças intergrupos.

4.12 Análise Semi-Quantitativa de Parâmetros Histopatológicos Hepáticos

Tabela 3: Análise Semi-Quantitativa de Parâmetros Histopatológicos Hepáticos

Características Histopatológicas	ID/Sedentários* (n=4)				ID/Treinados (n=4)				p (X^2)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Esteatose macrovesicular (0-3)	0	2	1	2	1	2	2	0	0,965
Esteatose microvesicular (0-3)	0	3	2	3	2	3	2	3	
Hipertrofia dos Hepatócitos (0-3)	0	2	2	2	1	2	1	2	
Focos inflamatórios (0-3)	0	2	3	3	2	2	3	0	

*Identificação realizada por micro chip, X^2 : Teste de Chi-quadrado

Nessa perspectiva visualizou-se através da análise histologia (Tabela 3) que os camundongos de ambos os grupos (n=4) apresentaram características similares na caracterização de esteatose macrovesicular e hipertrofia dos hepatócitos. Entretanto, quando analisamos a esteatose microvesicular observamos que os animais treinados apresentaram maior escore desta característica em relação aos sedentários. Nos focos inflamatórios foi observado que os animais sedentários apresentaram maior escore em

relação aos treinados. Contudo, o teste de X^2 não observou diferenças estatísticas entre os grupos ($p=0,965$)

4.13 Análise de Expressão Gênica Hepática

Após a extração do RNA total e devida análise de integridade por eletroforese, descritos anteriormente, realizou-se a avaliação intergrupos (SED e TF) após oito semanas de treinamento físico dos níveis de expressão gênica (*PGC1- α* , *CPT1- α* , *PPAR- α* e *SREBP1*) no fígado por *RT-PCR*, onde se realizou a análise da curva de *melting* que é utilizada para visualização da amplificação das sequências-alvo com aquecimento gradual dos produtos da reação. Após isso foi obtido o coeficiente $2\Delta\Delta CT$ e devida quantidade relativa relacionada ao nível de expressão de cada gene-alvo em relação ao endógeno.

Figura 28: Análise do nível de expressão hepática do gene *PGC1- α* após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos

Em relação ao nível de expressão gênica do *PGC1- α* (Figura 28), o principal regulador da biogênese mitocondrial, foi encontrado no ambiente intra-hepático que o grupo treinado ($n=7$) possui maior quantidade relativa da expressão deste gene em relação ao grupo sedentário ($n=7$), esta diferença foi significativa com $p=0,0023$ demonstrado pelo teste de Mann-Whitney. Tal resultado pode demonstrar uma maior funcionalidade energética via ativação mitocondrial através deste co-ativador. Tal resultado é extremamente importante no espectro da DHGNA, uma vez que os pacientes apresentam uma menor capacidade aeróbia e oxidativa.

Figura 29: Análise do nível de expressão hepática do gene CPT1- α após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos

Em relação ao nível de expressão gênica do CPT-1- α no fígado, o grupo sedentário (n=7) apresentou maior quantidade relativa de expressão gênica, em relação ao treinado (n=7), com diferença estatisticamente significativa p=0,0379, demonstrada pelo teste de *Mann-Whitney*.

Figura 30: Análise do nível de expressão hepática do gene PPAR- α após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos

Na análise do PPAR- α (Figura 30), o grupo treinado (n=7) demonstrou maiores valores de concentração relativa em comparação com o grupo sedentário (n=7), entretanto, o teste t não demonstrou diferenças intergrupos com p=06154. Tal gene é responsável por estimulação da atividade de oxidação mitocondrial, que culminam com modificações significativas no metabolismo energético, estas características são frequentemente encontradas em animais e indivíduos aerobiamente treinados e são importantes no combate a instalação e progressão da DHGNA.

Figura 31: Análise do nível de expressão hepática do gene SREBP1 após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos

No fígado também foi avaliado o nível de expressão gênica do principal regulador da *De novo lipogênese* o SREBP1 (Figura 31), este processo este sendo um dos principais responsáveis da instalação da DHGNA e de seus processos fisiopatológicos. Supreendentemente o grupo treinado (n=7) demonstrou maior quantidade relativa da expressão desse gene em comparação ao grupo sedentário (n=7), embora não foi visualizada diferença estatisticamente significativa pelo teste t com p=0,3092.

4.14 Expressão Gênica Muscular

De maneira similar realizou-se a avaliação intergrupos (SED e TF) após oito semanas de treinamento físico dos níveis de expressão gênica por *RT-PCR* (PGC1- α , CPT1- α , PPAR- α e SREBP1) no músculo esquelético soléo, este músculo possui característica predominantemente oxidativa com intensa atividade mitocondrial, onde se realizou a análise da curva de *melting* que é utilizada para visualização da amplificação das sequências-alvo com aquecimento gradual dos produtos da reação. Após isso foi obtido o coeficiente $\Delta\Delta CT$ e devida quantidade relativo relacionado ao nível de expressão de cada gene-alvo em relação ao endógeno.

Figura 32: Análise do nível de expressão muscular do gene PGC1- α após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos

De maneira similar às análises hepáticas, foi obtida a concentração relativa intramuscular (Soléo) do nível de expressão gênica do PGC-1 α (Figura 32), principal co-ativador do processo de biogênese mitocondrial. Desta forma encontrou-se que o grupo treinado (n=7) possuiu maior nível de expressão em relação ao grupo sedentário (n=5), demonstrando que realmente houve adaptações aeróbica proporcionadas pelo treinamento físico em oito semanas, e essa diferença foi estatisticamente significativa através da análise por teste t com p=0,0286.

Figura 33: Análise do nível de expressão muscular do gene CPT1- α após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos

No nível de expressão gênica do CPT-1- α (Figura 33) no músculo esquelético, o grupo treinado (n=7) apresentou maior quantidade relativa de expressão gênica, em relação ao grupo sedentário (n=7), com diferença estatisticamente significativa $p=0,0101$, demonstrada pelo teste t. Fisiologicamente isso representa que foi submetido ao treinamento físico durante oito semanas, possui maior capacidade de exportação de Acil-CoA para ser oxidada no interior das mitocôndrias, isso pode repercutir em uma maior ativação do metabolismo oxidativo, uma vez que também se demonstrou maior nível de expressão gênica do PGC-1- α .

Dentro do espectro da DHGNA, tal regulação positiva gerada pelo exercício físico pode influenciar de maior significante a prevenção das disfunções mitocondriais e óxido redutoras, comuns dentro da fisiopatologia da doença também em humanos, quanto em animais.

Figura 34: Análise do nível de expressão muscular do gene PPAR- α após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.

Na análise do PPAR- α (Figura 34), o grupo treinado (n=7) demonstrou maiores valores de concentração relativa em comparação com o grupo sedentário (n=7), entretanto, o teste t não demonstrou diferenças intergrupos com $p=0,2331$.

4.15 Análise da Atividade Enzimática e Estresse Oxidativo Hepático

Um dos aspectos mais relevantes dentro do estudo da fisiopatologia da DHGNA, é o estresse oxidativo e a atividades de enzimas anti e pró oxidantes hepáticas, além disso é de suma importância a visualização de como se comportam fatores não enzimáticos ligados ao estado redox. Além disso, em nosso estudo foi realizada a

visualização de como tais fatores interagem com o treinamento físico aeróbio em oito semanas no fígado de animais obesos com DHGNA.

4.16 Citrato Sintase

Figura 35: Análise da atividade enzimática de citrato sintase hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos

No presente estudo, analisou-se a atividade da enzima citrato sintase (Figura 35) no fígado, responsável pela estimulação da biogênese mitocondrial e produção de energia. Os animais treinados (n=6) demonstraram maior atividade enzimática de citrato sintase em comparação com os animais sedentários (n=6), esta diferença foi estatisticamente significativa $p=0,0049$, através do teste t. Isso pode demonstrar que o protocolo de treinamento físico aeróbio com intensidade de 60% da capacidade máxima do animal, foi efetivo para estimulação da capacidade aeróbia e metabolismo oxidativo destes animais. Além disso, a citrato sintase é um excelente indicador de treinabilidade em resposta ao estímulo aeróbio.

4.17 Superóxido Dismutase

Figura 36: Análise do nível enzimático de SOD hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.

Em relação a SOD (Figura 36), esta enzima é fundamental na proteção do ambiente intracelular contra o estresse oxidativa e suas espécies, pois catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Interessantemente os animais treinados (n=6) apresentaram uma tendência menor atividade desta enzima em relação aos sedentários (n=7), entretanto, sem diferença estatística com valor de $p=0,06$ (teste t).

4.18 Catalase

Figura 37: Análise da atividade enzimática de catalase hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos

Dentro das enzimas com atividade anti-oxidante a atividade da catalase (Figura 37) é fundamental para transformação ou conversão química do peróxido de hidrogênio em água+oxigênio molecular, tal fenômeno é fundamental para a proteção do ambiente celular contra espécies reativas do oxigênio. Supreendentemente os animais treinados apresentaram uma menor atividade desta enzima em relação aos animais sedentário, entretanto sem diferenças significativas $p=0,3650$, demonstrada pelo teste t.

4.19 Malonaldeído

Figura 38: Análise do nível enzimático de MDA hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos

Na perspectiva sobre os compostos orgânicos que interagem com o estado redox e integridade da membrana celular, foi avaliada o malonaldeído (Figura 38), este composto tem íntima relação com a peroxidação de lipídeos contidos na membrana celular. Na comparação intergrupo os animais treinados (n=6) apresentaram maiores valores médios em relação aos sedentários (n=5), entretanto, não houve diferença significativa com $p=0,6170$ (teste t).

4.20 Carbonilas

Figura 39: Análise do nível enzimático de carbonilas hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos

Foi avaliada a atividade das carbonilas (Figura 39), este composto possui relação com a oxidação de proteínas contidos no ambiente celular. Na comparação intergrupo os animais treinados (n=5) apresentaram menores valores médios em aos sedentários (n=7), entretanto não houve diferença significativa com $p=0,8085$ (teste t).

4.21 Sulfidrilas

Figura 40: Análise do nível enzimático de sulfidrilas hepáticas após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos.

Buscando a analisar de maneira ampla a estrutura dos componentes ligados ao estresse oxidativo, foi avaliado a atividade de sulfidrilas (Figura 40). Este composto é um componente que faz parte de um complexo não enzimático de defesa anti-oxidante do

organismo. Os animais treinados (n=6) possuíram uma maior atividade deste composto em relação ao grupo sedentário (n=6) e essa diferença foi estatisticamente significativa com $p=0,0238$.

4.22 Glutathione S transferase (GST)

Figura 41: Análise do nível de glutathione S transferase hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos

Outro componente deste complexo não enzimático, a glutathione S transferase (Figura 41) tem uma função importante na metabolização de compostos xenobióticos (compostos estranhos ao sistema orgânico ou biológico), tendo impacto positivo na estabilidade e controle de produção de estresse oxidativo nas células. Os animais treinados (n=5) demonstraram uma tendência a maiores valores médios em relação aos animais sedentários (n=6), entretanto sem diferença significativa com $p=0,0844$ (teste t).

4.23 Glutathione oxidada (GSH)

Figura 42: Análise do nível de glutathione oxidada hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos

A glutathiona oxidada tem uma função importante na estabilização compostos metabolicamente ativos como a água oxigenada e reativos a espécies produzidas em resposta ao oxigênio. Os animais treinados (n=6) demonstraram maiores valores médios em relação aos animais sedentários (n=7), com diferença significativa com $p=0,001$ (teste t).

4.24 Estado redox (GSH/GSSG)

Figura 43: Análise do nível do estado redox hepática medido pela razão GSH/GSSG após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos

Assim também avaliamos a taxa destes elementos do complexo não-enzimático que são responsáveis por proteger a célula de compostos orgânicos estressantes, por isso foi realizada a razão relacionada ao estado redox. No presente estudo, o grupo treinado (n=6) demonstrou níveis estatisticamente mais altos de atividade de todos os componentes não enzimáticos com o seguinte valor e $GSH / GSSG = 0,0291$ em comparação com camundongos sedentários (n=7).

4.25 β -hidroxiacetyl-co-a desidrogenasse

Figura 44: Análise do nível enzimático de β -hidroxiacetyl-co-a desidrogenasse :hepática após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos

Finalmente nós avaliamos, no fígado, a atividade desta enzima metabólica β -HAD (β -hidroxiacetyl-co-desidrogenase) (Figura 44), relacionada à atividade mitocondrial, essa enzima participa da terceira reação de beta oxidação e pertence à família das oxidorreductases específicas que atuam no grupo de doadores CH-OH com NAD + ou NADP + comoceptor.

Dentro dos resultados podemos constatar que os camundongos treinados (n=5) apresentaram atividade significativamente maior desta enzima metabólica quando comparados aos camundongos sedentários (n=6) com os respectivo valor de $p = 0,01$. Esse resultado demonstra que o treinamento aplicado nesses animais obesos com DHGNA e deficiência de leptina foi capaz de promover estimulação aeróbica eficiente no fígado desses animais, o que combate diretamente o acúmulo excessivo de gordura e reduz as condições fisiopatogênicas características da DHGNA.

4.26 Análise da Treinabilidade Aeróbia por Atividade de Citrato sintase muscular

Figura 45: Análise da atividade enzimática de citrato sintase muscular após oito semanas de treinamento físico em camundongos obesos

No presente estudo, analisou-se a atividade da enzima citrato sintase no músculo gastrocnêmico (Figura 45). Os animais treinados ($n=7$) demonstraram maior atividade enzimática de citrato sintase em comparação com os animais sedentários ($n=5$), esta diferença foi estatisticamente significativa $p=0,006$, através do teste t.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, o exercício aeróbico foi responsável melhorou o controle dos pesos corpóreo, do fígado e retroperitoneal, a hiperfagia. Além disso, oito semanas de exercício em camundongos ob/ob com DHGNA, melhoraram os componentes não enzimáticos ligados ao metabolismo oxidativo e biogênese mitocondrial. Contudo, não foi possível observar melhora histológica do fígado em 8 semanas de TFA.

A inatividade física é uma condição comumente encontrada em pacientes com DHGNA, levando a condições de sobrepeso, obesidade em diferentes níveis [47]. Estudos recente demonstram estes pacientes não somente possuem baixos níveis de prática de atividade física regular, como também um desregulação em diversos fatores do estilo de vida, dentre eles: alto consumo de gordura satura e carboidratos simples, desregulação da saúde intestinal (microbiota), aumento na expressão de neuropeptídeos orexígenos (neuropeptídeo Y e peptídeo relacionado a agouti-AGRP) expressos na porção ventrolateral do núcleo arqueado do hipotálamo e redução em anorexígenos (pró-opiomelanocortina-POMC e transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina-CART), expressos no núcleo arqueado do hipotálamo em sua porção ventro-medial, que influenciam no controle/desregulação alimentar, endócrino e inflamatória, repercutindo em um ambiente obesogênico [48,49].

No presente estudo, foram observadas diferenças estatisticamente significativas em camundongos obesos, relação a três medidas de peso corporal (peso médio em gramas, percentual e evolução do peso corporal no grupo treinado em comparação aos animais que não realizaram o protocolo de treinamento físico aeróbico de oito semanas), demonstrando uma redução no comportamento hiperfágico destes animais, que lhes são característicos uma vez que o déficit em leptina contribui para essa desregulação sem freios do peso corporal. Além disso em relação a evolução do peso corporal, visualizada semana a semana, os animais treinados demonstram uma maior capacidade de frenagem no ganho de PC, em relação aos animais sedentários.

Vilar Gomez e colaboradores [50], em estudo recente publicado na associação europeia de doenças hepáticas (EASL), demonstraram que perda de peso em diferentes níveis podem gerar uma série de benefícios para a saúde hepática e metabólica de pacientes com DHGNA e, que 52 semanas de atividade física regular podem ocasionar 10% de perda de PC, levando o indivíduo a reverter, em humanos, em 90% a esteatohepatite não alcoólica (forma mais grave da DHGNA) e regredir em 81% a fibrose hepática [50]. Esta melhora no controle do peso corporal, também foi encontrada em um

estudo prévio do nosso grupo, que demonstrou em animais obesos com déficit em leptina isogênicos que o TFA, a partir da terceira semana, foi capaz de produzir melhora no controle de peso destes animais com o protocolo, e estas diferenças foram mantidas até a oitava semana de intervenção, entretanto não foram capazes de produzir melhoras significativas na histologia hepática destes animais como no presente estudo [62].

Em relação ao consumo de água, obtivemos um dado surpreendente onde os animais treinados apresentaram após oito semanas de treinamento aeróbio menor consumo médio de água. Geralmente a prática de exercício físico em geral estimula o maior consumo hídrico, em contrapartida isso pode representar que os animais treinados apresentaram uma maior eficiência no controle térmico durante o esforço físico com predominância aeróbia. Este cenário é comumente encontrado em indivíduos que possuem uma maior adaptabilidade ao esforço físico, além disso depende de uma pluralidade de fatores orgânicos e genéticos, que influenciam no grau de sudorese e exposição hídrica durante o exercício físico/atividade física [51].

No presente estudo, também foram analisadas variáveis ligadas ao treinamento físico (distância percorrida, tempo de duração e velocidade pico) que foram avaliadas em dois momentos: antes e após as oito semanas de aplicação do protocolo. Elas proporcionam um indicativo de treinabilidade, ou seja, adaptabilidade aos estímulos relacionados ao exercício físico. Nessa perspectiva, em relação à distância percorrida (metros) e tempo de duração (minutos), os animais treinados demonstraram valores médios significativamente maiores em relação aos sedentários. Tais resultados demonstram que o treinamento físico, em oito semanas, foi capaz de proporcionar maior aptidão física nestes animais. Em um estudo prévio do nosso grupo [62], realizado com o mesmo modelo experimental, foi encontrado que os animais treinados demonstraram maior tempo de duração em ambos os momentos, pré e pós intervenção de 8 semanas com treinamento físico. Isso demonstra que o este protocolo é reprodutível em relação as variáveis ligadas ao TFA, além disso, estes mesmos animais demonstraram maior capacidade energética, avaliado por calorimetria indireta quando comparados aos sedentários.

A velocidade pico (km/h) que representam o valor máximo obtido durante a execução do teste de esforço, também se demonstrou estatisticamente significativa nos animais treinados quando comparados aos que não realizaram o treinamento físico. Tal resultado indica que houveram maiores níveis de adaptação cardiorespiratória, ou

capacidade aeróbia, após o treinamento físico aeróbio em intensidade moderada. Este resultado, corrobora como os achados de *Linden* e colaboradores [52] que, em animais *Otsuka Long-Evans Tokushima fatty*, a inatividade física neste modelo experimental proporcionou uma baixa aptidão cardiorrespiratória com estímulo da síntese da DHGNA, estando diretamente ligada a redução da função mitocondrial e aumento de espécies reativas produzidas pelo oxigênio [52].

Outro fator que está diretamente associado a aptidão aeróbia é o acúmulo de tecido adiposo branco em áreas centrais e periféricas do nosso organismo. Sendo este padrão de distribuição relacionado ao sexo, tendo os homens uma predominância de deposição central, enquanto que as mulheres na periferia corporal [53]. Em pacientes com sobrepeso, obesidade e DHGNA, comumente está relacionado com a aumento na incidência de doenças cardiometabólicas, inatividade física, desregulação hormonal, diabetes mellitus tipo 2 e dentre outros [54,55]. No fígado o excesso de gordura é responsável diretamente pela resistência à insulina, processos pró-inflamatórios, EROS, disfunções energéticas, fibrogênese e apoptose celular [56]. Em um estudo realizado por Ok e colaboradores [63] com modelo de obesidade em C57BL6 induzida por dieta *high fat* que o TFA associado a dieta em oito semanas foi capaz potencializar as expressões de proteína p-AMPK e CPT1, levando à diminuição do peso corporal e gordura do fígado, por estimulação da biogênese mitocondrial que, por sua vez, aumenta a capacidade de oxidação lipídica intra-hepática. Além disso, melhoraram a tolerância à glicose e diminuíram a gordura do fígado, embora, o tratamento do exercício sozinho não teve efeito na perda de peso em comparação com o pré-exercício.

Em nosso estudo realizou-se a pesagem absoluta (gramas) e relativa do fígado (miligramas) e tecidos adiposos (retroperitoneal, periepididimal e inguinal). Os animais treinados demonstraram menor peso absoluto e relativo no fígado e no tecido adiposo retroperitoneal (visceral) em relação aos animais sedentários. Isso pode indicar uma maior capacidade de oxidação lipídica nestas regiões ocasionada pela execução do protocolo de treinamento físico culminando em melhora em condições associadas na patogênese da NAFLD.

Está consolidado na literatura que o desenvolvimento da DHGNA é regulado por inúmeros fatores (acúmulo supranormal de lipídeos intra-hepáticos, resistência à insulina, redução na capacidade de β -oxidação e dentre outras), mas nenhuma é tão importante

quanto as disfunções mitocondriais. Wei e colaboradores [57], em um artigo de revisão contextualizou que tais desregulações energéticas são mediadas pelos diferentes níveis de expressão gênica do PGC-1 α , tal co-ativador regula a ativação ou desativação de uma via de sinalização referente a biogênese mitocondrial (CPT-1 α , PPAR- α , TFAM, NRF-1 e 2, e etc.) [57]. Em estudos recentes foi demonstrado que camundongos inativos fisicamente possuem menores níveis de expressão gênica de PGC-1 α , e que isso repercutiu para instalação do fenótipo obesogênico, danos histológicos, estresse oxidativo e doença hepática gordurosa não alcoólica [58].

Quando avaliado em nosso estudo a expressão gênica de PGC-1 α hepática em camundongos obesos, o grupo treinado demonstrou um significativo incremento em relação ao grupo sedentário. Além disso, nos também avaliamos o PPAR- α que demonstrou maior valor médio nos animais treinados, entretanto, sem diferença significativa. Supreendentemente, nos encontramos que o grupo de animais treinados possuiu um nível significativamente menor de expressão gênica de CPT-1 α intra-hepática em relação aos sedentários, a redução na expressão deste transportador de acil-CoA, causa influência na capacidade de β -oxidação mitocondrial, e isso pode estar relacionado com o resultado encontrado no SREBP1, que mesmo sem apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos, se demonstrou maior nos animais treinados.

No músculo esquelético (Soléo) por sua vez também encontramos nos animais treinados um significativo aumento na expressão gênica de PGC-1 α nos animais que realizaram treinamento físico, entretanto, quando analisamos o nível de CPT-1 α , os animais treinados possuíram um nível de expressão gênica maior deste transportador em relação aos animais sedentários. Não foi obtida diferença significativa nos níveis de PPAR- α na comparação intergrupo.

Em contrapartida, um estudo anterior, Evangelista e colaboradores [62], encontraram um maior nível de expressão gênica de CPT-1 α intra-hepática em camundongos obesos com déficit em leptina que foram submetidos ao mesmo protocolo de treinamento físico aeróbio oito semanas após o desmame, além disso, estes animais apresentaram melhor perfil metabólico medido por calorimetria indireta, e obtiveram níveis significantes na expressão de SREBP1. Os autores não realizaram análises de expressão gênica muscular [59].

Na presente investigação, também foram analisados, no fígado, os níveis de MDA e Carbonilas, tais compostos possuem relação com a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas respectivamente. Supreendentemente, os animais treinados demonstraram valores maiores de MDA, quando comparado com os sedentários, fisiologicamente repercutindo em maior peroxidação de lipídios contidos na membrana plasmática, entretanto sem diferenças significativas. Nas carbonilas, na análise intergrupos os animais treinados apresentaram menores valores médios, mas sem diferenças estatísticas, isso pode representar uma menor oxidação de proteínas e um menor dano no ambiente celular.

Este resultado encontrado neste modelo experimental de camundongos obesos com déficit em leptina foi interessante, visto que a prática regular de exercício físico é capaz de melhorar e reduzir a produção de compostos relacionados à agressão e degradação da membrana celular [60].

Entretanto, a depender da intensidade e duração aplicadas durante o exercício físico aeróbio, este fenômeno pode ser visualizada como uma adaptação aguda ao estímulo recebido, como demonstrado no estudo de Sun e colaboradores [61], que demonstraram que 4 semanas de exercício físico aeróbio (*endurance*) com alta intensidade e curta duração foi capaz de aumentar a produção de MDA e ROS, entretanto o grupo de ratos que praticaram e estavam suplementados com vitaminas do complexo b, creatina etc., possuíram maior atividade nos complexos mitocondriais I, IV e V. Isso demonstra que se deve avaliar de forma crônica, e em diferentes padrões de intensidade-duração, o efeito do exercício físico aeróbio sobre os compostos pró-oxidantes e defesas antioxidantes [61]. Da mesma forma em um estudo prévio, Megan e colaboradores [64] encontraram que atividade física moderada em camundongos C57BL6, foi capaz de melhorar a autofagia basal no fígado, atividade mitocondrial e produção de uma sobrecarga de lipídeos intra-hepático, garantindo uma maior proteção contra lesões hepáticas em diferentes níveis (leve ao severa).

Também foram analisados componentes do complexo enzimático relacionados as defesas antioxidantes SOD e CAT, responsável pela dismutação e conversão de compostos relacionados ao oxigênio celular. Desta forma animais treinados demonstraram uma menor atividade enzimática, no entanto, não apresentaram diferença estatística. Além disso, foi analisada na comparação intergrupo a atividade de glutathione S transferase, nessa perspectiva os animais treinados apresentaram maior atividade deste componente, entretanto, não foi visualizada significância. Esse resultado, difere dos

achados encontrados na literatura, uma vez que a prática regular de exercício físico aeróbio eleva a atividade de SOD e CAT em diferentes órgãos: fígado, músculo esquelético e etc.

Deve-se considerar que em nosso estudo utilizamos animais isogênicos geneticamente modificados com déficit em leptina que possuem uma estrutura metabólica diferente, que deve ser estudada mais profundamente e pode ter causado esta desregulação neste complexo enzimático.

Em virtude destes resultados, decidimos analisar elementos relacionados à complexo não enzimático de defesa antioxidante: Glutathione Oxidada, Estado Redox via razão entre GSH/GSSG e sulfidrilas. Com isso visualizamos que os animais treinados apresentarem valores significativamente maiores em todos os componentes analisados do complexo não enzimático em relação aos animais sedentários. Em adição, realizamos a análise de β -HAD e citrato sintase hepática nestes animais, pois estes elementos estão intimamente ligados a funcionalidade e ativação mitocondrial.

Os animais treinados também demonstraram um incremento significativo em ambas as enzimas metabólicas. Estes resultados são de suma importância dentro do espectro da DHGNA, uma vez que a ativação da via dependente da ação deste complexo não enzimática garante efeito protetivo ao fígado contra a produção de composto bioativos relacionados ao estresse oxidativo.

Este resultado colabora como o estudo de *Morris* e colaboradores [44], que analisou, em animais com baixa e alta capacidade aeróbia, o comportamento de glutathione peroxidase (Gpx), e aspectos inflamatório como os receptores *Toll-like* em suas subunidades 2, 4, 9 e aspectos relacionados a função das mitocôndrias como a taxa de oxidação de ácidos graxos (FAO) com finalidade de se associar com a transição do quadro de DHGNA para EHNA. Os resultados demonstraram que os animais com baixa aptidão aeróbia possuíram menor defesa contra o estresse oxidativo, maior resposta pró-inflamatória e decréscimo na atividade mitocondrial, causando maior suscetibilidade para o estágio mais severo da DHGNA [44].

Em relação às variáveis histológicas, em um estudo anterior de nosso grupo com mesmo modelo de obesidade animal, a análise semi-quantitativa de maneira similar não demonstrou diferenças nos parâmetros analisados. Tais resultados confirmam que o tempo de intervenção de oito semanas é insuficiente para promover melhorias na

histopatologia hepática neste modelo. Entretanto em um modelo de obesidade induzido por dieta *high fat* em camundongos C57BL6, Ok e colaboradores [63] demonstraram que o treinamento físico aeróbio em oito semana associados à dieta foi capaz de gerar benefícios na histologia hepática.

Estudos com diferentes padrões de intensidade, frequência e duração do exercício aeróbio são escassos e ainda serão necessários para compreender melhor os mecanismos relacionados ao estresse oxidativo e funcionalidade mitocondrial, além de como o TFA influência nas modificações histológicas proporcionadas pela DHGNA.

6. CONCLUSÕES

1. Nossos dados demonstram que treinamento físico aeróbio aplicado durante oito semanas é capaz de melhorar o controle do peso corporal em camundongos (*ob/ob*).
2. O treinamento físico aeróbio aplicado durante oito semanas foi capaz de melhorar comportamento hiperfágico em camundongos (*ob/ob*).
3. O treinamento físico aeróbio em oito semanas foi capaz de melhorar funcionalidade mitocondrial em camundongos (*ob/ob*).
4. O treinamento físico aeróbio aplicado durante oito semanas foi capaz de melhorar metabolismo oxidativo em camundongos (*ob/ob*).
5. O treinamento físico aeróbio aplicado durante oito semanas não foi capaz de promover melhora na histologia de camundongos obesos (*ob/ob*) com DHGNA. Há necessidade de intervenção a longo prazo com treinamento físico aeróbio para se avaliar melhorias histológicas neste modelo genético de obesidade e DHGNA.

7. ANEXOS

ANEXO B: PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **"EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCÓOLICA (DHGNA) EM CAMUNDONGOS OBESOS"**, registrada com o nº 040/17, sob a responsabilidade de Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira e Matheus Santos de Sousa Fernandes, apresentada pelo Departamento de Gastroenterologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 05.04.17

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 09-02-2017 Término: 08-02-2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico ob/ob
Nº de animais	12
Peso/Idade	6 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 05 de Abril de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

ANEXO C: PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PAULO AO ADENDO REALIZADO PARA INCREMENTO NO NÚMERO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 03.10.17, APROVOU o documento abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº 040/17 intitulado "EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (DHGNA) EM CAMUNDONGOS OBESOS" apresentado pelo Departamento de Gastroenterologia

- Acréscimo de 08 camundongos isogênicos ob/ob machos de 6 semanas

Pesquisador Responsável: **Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira**

CEUA-FMUSP, 03 de Outubro de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

ANEXO D: PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO REALIZADO NO PRIMEIRO LOTE EXPERIMENTAL DA 1ª A 4ª SEMANA EM CAMUNDONGOS OBESOS COM DHGNA.

TREINAMENTO FÍSICO				25% velocidade treino		0,2
PERÍODO: 28/08/17 a 27/10/17				62,5% velocidade treino		0,4
				50% velocidade treino		0,4
				mais 0,1 km/h dos 25%		0,3
Teste de esforço (PRÉ-TF): 25/08/2016				menos 0.1 km/h da velocidade treino		0,6
Velocidade Treino: 0,7 km/h				velocidade treino (60% velocidade ma		0,7

TREINAMENTO FÍSICO COM VELOCIDADE DE 0,7km/h							
	Data	Duração	Velocidade				
			Aquecimento		Corrida	Recuperação	
Semana 1	28/ago	25'	~	0,2km/h (10')	0,4 km/h (10')	0,4 km/h (5')	~
	29/ago	30'	0,2 km/h (5')	0,4 km/h (5')	0,6 km/h (10')	0,4 km/h (5')	0,2km/h (5')
	30/ago	35'	0,3 km/h (5')	0,4 km/h (5')	0,6 km/h (15')	0,4 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	31/ago	35'	0,3 km/h (5')	0,4 km/h (5')	0,6 km/h (15')	0,4 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	01/set	40'	0,4 km/h (5')	0,4 km/h (5')	0,7 km/h (20')	0,4 km/h (5')	0,4 km/h (5')
Semana 2		Duração	Velocidade				
			Aquecimento		Corrida	Recuperação	
	04/set	35'	0,3 km/h (5')	0,4 km/h (5')	0,6 km/h (15')	0,4 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	05/set	40'	0,4 km/h (5')	0,4 km/h (5')	0,7 km/h (20')	0,4 km/h (5')	0,4 km/h (5')
	06/set	45'	0,4 km/h (5')	0,6km/h (5')	0,7 km/h (25')	0,6 km/h (5')	0,4 km/h (5')
Semana 3	07/set	45'	0,4 km/h (5')	0,6km/h (5')	0,7 km/h (25')	0,6 km/h (5')	0,4 km/h (5')
	08/set	50'	0,4 km/h (5')	0,6km/h (5')	0,7 km/h (30')	0,6 km/h (5')	0,4 km/h (5')
		Duração	Velocidade				
			Aquecimento		Corrida	Recuperação	
	11/set	50'	0,4 km/h (5')	0,6 km/h (5')	0,7 km/h (30')	0,6 km/h (5')	0,4 km/h (5')
Semana 4	12/set	55'	0,4 km/h (5')	0,6 km/h (5')	0,7 km/h (35')	0,6 km/h (5')	0,4 km/h (5')
	13/set	60'	0,4 km/h (5')	0,6 km/h (5')	0,7 km/h (40')	0,6 km/h (5')	0,4 km/h (5')
	14/set	60'	0,4 km/h (5')	0,6 km/h (5')	0,7 km/h (40')	0,6 km/h (5')	0,4 km/h (5')
	15/set	60'	0,4 km/h (5')	0,6 km/h (5')	0,7 km/h (40')	0,6 km/h (5')	0,4 km/h (5')
		Duração	Velocidade				
			Aquecimento		Corrida	Recuperação	
	18/set	60'	0,4 km/h (5')	0,6 km/h (5')	0,7 km/h (40')	0,6 km/h (5')	0,4 km/h (5')
	19/set	60'	0,4 km/h (5')	0,6 km/h (5')	0,7 km/h (40')	0,6 km/h (5')	0,4 km/h (5')
	20/set	60'	0,4 km/h (5')	0,6 km/h (5')	0,7 km/h (40')	0,6 km/h (5')	0,4 km/h (5')
	21/set	60'	0,4 km/h (5')	0,6 km/h (5')	0,7 km/h (40')	0,6 km/h (5')	0,4 km/h (5')
	22/set	60'	0,4 km/h (5')	0,6 km/h (5')	0,7 km/h (40')	0,6 km/h (5')	0,4 km/h (5')

ANEXO E: PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO REALIZADO NO PRIMEIRO LOTE EXPERIMENTAL DA 4ª A 8ª SEMANA EM CAMUNDONGOS OBESOS COM DHGNA.

TREINAMENTO FÍSICO COM VELOCIDADE DE 0,6 km/h							
	Data	Duração	Velocidade				
			Aquecimento	Corrida	Recuperação	Situação	
Semana 5	25/set	50'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (30')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	26/set	55'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (35')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	27/set	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	28/set	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	29/set	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
Semana 6	Velocidade						
	Data	Duração	Aquecimento	Corrida	Recuperação		
	02/out	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	03/out	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	04/out	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	05/out	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	06/out	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
Semana 7	Velocidade						
	Data	Duração	Aquecimento	Corrida	Recuperação		
	09/out	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	10/out	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	11/out	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	12/out	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	13/out	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
Semana 8	Velocidade						
	Data	Duração	Aquecimento	Corrida	Recuperação		
	16/out	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	17/out	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	18/out	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	19/out	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')
	20/out	60'	0,3 km/h (5')	0,5 km/h (5')	0,6 km/h (40')	0,5 km/h (5')	0,3 km/h (5')

REFERÊNCIAS

1. Rinella, Mary E., and Arun J. Sanyal. "Management of NAFLD: a stage-based approach." *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 13.4 (2016): 196.
2. Ratziu, Vlad. "Non-pharmacological interventions in non-alcoholic fatty liver disease patients." *Liver International* 37. S1 (2017): 90-96.
3. Rayyan, Yaser Mohammed, and Reema Fayeze Tayyem. "Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Associated Dietary and Lifestyle Risk Factors." *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* (2018).
4. Neuschwander-Tetri, Brent A. "Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease." *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 16.4 (2013): 446-452.
5. Oliveira, Claudia P., et al. "Nutrition and physical activity in nonalcoholic fatty liver disease." *Journal of diabetes research* 2016 (2016).
6. Cintra, Dennys E., et al. "Reversion of hepatic steatosis by exercise training in obese mice: the role of sterol regulatory element-binding protein-1c." *Life sciences* 91.11-12 (2012): 395-401.
7. Guo, Rui, et al. "Beneficial mechanisms of aerobic exercise on hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease." *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 14.2 (2015): 139-144.
8. Oliveira, C. P. M. S., et al. "Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease." *Brazilian journal of medical and biological research* 39.2 (2006): 189-194.
9. Yki-Järvinen, Hannele. "Pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)." *International Textbook of Diabetes Mellitus* 2 (2015): 283.
10. Ringseis, Robert, et al. "Metabolic signals and innate immune activation in obesity and exercise." *Exercise immunology review* 21 (2015).
11. Koo, Seung-Hoi. "Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis." *Clinical and molecular hepatology* 19.3 (2013): 210.
12. Zou, Tian-Tian, et al. "Lifestyle interventions for patients with nonalcoholic fatty liver disease: a network meta-analysis." *European journal of gastroenterology & hepatology* 30.7 (2018): 747-755.
13. Loomba, Rohit, and Helena Cortez-Pinto. "Exercise and improvement of NAFLD: Practical recommendations." *Journal of hepatology* 63.1 (2015): 10-12.

14. Bae, Ji Cheol, et al. "Regular exercise is associated with a reduction in the risk of NAFLD and decreased liver enzymes in individuals with NAFLD independent of obesity in Korean adults." *PloS one* 7.10 (2012): e46819.
15. Tsunoda, Kenji, et al. "Impact of physical activity on nonalcoholic steatohepatitis in people with nonalcoholic simple fatty liver: A prospective cohort study." *Preventive medicine* 88 (2016): 237-240.
16. Rector, R. Scott, and John P. Thyfault. "Does physical inactivity cause nonalcoholic fatty liver disease?" *Journal of applied physiology* 111.6 (2011): 1828-1835.
17. Hannah, William N., and Stephen A. Harrison. "Lifestyle and dietary interventions in the management of nonalcoholic fatty liver disease." *Digestive diseases and sciences* 61.5 (2016): 1365-1374.
18. Begriche, Karima, et al. "Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it." *Mitochondrion* 6.1 (2006): 1-28.
19. Erlich, Avigail T., et al. "Function of specialized regulatory proteins and signaling pathways in exercise-induced muscle mitochondrial biogenesis." *Integrative medicine research* 5.3 (2016): 187-197.
20. Thyfault, John P., et al. "Rats selectively bred for low aerobic capacity have reduced hepatic mitochondrial oxidative capacity and susceptibility to hepatic steatosis and injury." *The Journal of physiology* 587.8 (2009): 1805-1816.
21. Rector, R. Scott, et al. "Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model." *Journal of hepatology* 52.5 (2010): 727-736.
22. Pérez-Carreras, Mercedes, et al. "Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology* 38.4 (2003): 999-1007.
23. Begriche, Karima, et al. "Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it." *Mitochondrion* 6.1 (2006): 1-28.
24. Gonçalves, Inês O., et al. "Exercise as a therapeutic tool to prevent mitochondrial degeneration in nonalcoholic steatohepatitis." *European journal of clinical investigation* 43.11 (2013): 1184-1194.

25. Sanyal, Arun J., et al. "Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities." *Gastroenterology* 120.5 (2001): 1183-1192.
26. Pessayre, Dominique. "Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease." *Journal of gastroenterology and hepatology* 22.s1 (2007).
27. Murray, Robert K., et al. *Harper: bioquímica ilustrada*. McGraw-Hill, 2014.
28. Morris, E. Matthew, et al. "Mitochondria and redox signaling in steatohepatitis." *Antioxidants & redox signaling* 15.2 (2011): 485-504.
29. Caldwell, Stephen H., et al. "Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis." *Journal of hepatology* 31.3 (1999): 430-434.
30. Rolo, Anabela P., João S. Teodoro, and Carlos M. Palmeira. "Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis." *Free Radical Biology and Medicine* 52.1 (2012): 59-69.
31. de Cleve, Roberto, et al. "Use of noninvasive markers to predict advanced fibrosis/cirrhosis in severe obesity." *Surgery for Obesity and Related Diseases* 12.4 (2016): 862-867.
32. Pellicoro, Antonella, et al. "Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ." *Nature Reviews Immunology* 14.3 (2014): 181.
33. Petta, S., et al. "Sarcopenia is associated with severe liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease." *Alimentary pharmacology & therapeutics* 45.4 (2017): 510-518.
34. Bataller, Ramón, and David A. Brenner. "Liver fibrosis." *The Journal of clinical investigation* 115.2 (2005): 209-218.
35. Ucar, Fatma, et al. "The relationship between oxidative stress and nonalcoholic fatty liver disease: Its effects on the development of nonalcoholic steatohepatitis." *Redox report* 18.4 (2013): 127-133.
36. Thirupathi, Anand, and Claudio Teodoro de Souza. "Multi-regulatory network of ROS: the interconnection of ROS, PGC-1 alpha, and AMPK-SIRT1 during exercise." *Journal of physiology and biochemistry* 73.4 (2017): 487-494.
37. Attardi, Giuseppe, and Gottfried Schatz. "Biogenesis of mitochondria." *Annual review of cell biology* 4.1 (1988): 289-331.
38. Ernster, Lars, and Gottfried Schatz. "Mitochondria: a historical review." *J Cell Biol* 91.3 (1981): 227s-255s.
39. Berg, Jeremy M., et al. "Bioquímica." *Bioquímica*. 2014.

40. Liang, Huiyun, and Walter F. Ward. "PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism." *Advances in physiology education* 30.4 (2006): 145-151.
41. Zhang, Bei B., Gaochao Zhou, and Cai Li. "AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome." *Cell metabolism* 9.5 (2009): 407-416.
42. Linden, Melissa A., et al. "Aerobic exercise training in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease related fibrosis." *The Journal of physiology* 594.18 (2016): 5271-5284.
43. Ferreira, Julio CB, et al. "Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 34.8 (2007): 760-765.
44. Morris, E. Matthew, et al. "Aerobic capacity mediates susceptibility for the transition from steatosis to steatohepatitis." *The Journal of physiology* (2017). 2017;595(14):4909-26.
 Perfield, James W., et al. "Altered hepatic lipid metabolism contributes to nonalcoholic fatty liver disease in leptin-deficient Ob/Ob mice." *Journal of obesity* 2013 (2013).
45. Liang, W., Menke, A. L., Driessen, A., Koek, G. H., Lindeman, J. H., Stoop, R., ... & van den Hoek, A. M. (2014). Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. *PloS one*, 9(12), e115922.
46. Enes, C. C., & Slater, B. (2010). Obesidade na adolescência e seus principais fatores determinantes. *Revista Brasileira de epidemiologia*, 13, 163-171.
47. de Piano, A., Tock, L., Carnier, J., Foschini, D., de Lima Sanches, P., Corrêa, F. A., ... & de Mello, M. T. (2010). The role of nutritional profile in the orexigenic neuropeptide secretion in nonalcoholic fatty liver disease obese adolescents. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 22(5), 557-563.
48. Tock, L., Carnier, J., Foschini, D., Sanches, L. P., Correa, F. A., Oyama, L. M., ... & Dâmaso, A. (2010). The role of nutritional profile in the orexigenic neuropeptide secretion in nonalcoholic fatty liver disease obese adolescents. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 22(5), 557-563.
49. Loomba, R., & Cortez-Pinto, H. (2015). Exercise and improvement of NAFLD: Practical recommendations. *Journal of hepatology*, 63(1), 10-12.

50. Machado-Moreira, C. A., Vimieiro-Gomes, A. C., Silami-Garcia, E., & Rodrigues, L. O. C. (2006). Hidratação durante o exercício: a sede é suficiente. *Rev Bras Med Esporte*, 12(6), 405-9.
51. Linden, M. A., Meers, G. M., Ruebel, M. L., Jenkins, N. T., Booth, F. W., Laughlin, M. H., ... & Rector, R. S. (2013). Hepatic steatosis development with four weeks of physical inactivity in previously active, hyperphagic OLETF rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304(9).
52. Rezende, S. B. B., Confortin, F., dos Reis Rezer, C., Pozzobon, M. E., & Back, E. (2014). Gordura corporal, imagem corporal e maturação sexual de jovens atletas. *RBNE-Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, 8(44).
53. Abdelmalek, M. F., Suzuki, A., Guy, C., Unalp-Arida, A., Colvin, R., Johnson, R. J., ... & Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. (2010). Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 51(6), 1961-1971.
54. McMillan, K. P., Kuk, J. L., Church, T. S., Blair, S. N., & Ross, R. (2007). Independent associations between liver fat, visceral adipose tissue, and metabolic risk factors in men. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 32(2), 265-272.
55. Sun L, Shen W, Liu Z, Guan S, Liu J, Ding S. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. *Life Sci* 2010; 86:39–44.
56. Gonçalves, I. O., Maciel, E., Passos, E., Torrella, J. R., Rizo, D., Viscor, G., ... & Ascensão, A. (2014). Exercise alters liver mitochondria phospholipidomic profile and mitochondrial activity in non-alcoholic steatohepatitis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 54, 163-173.
57. George, A. S., Bauman, A., Johnston, A., Farrell, G., Chey, T., & George, J. (2009). Independent effects of physical activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 50(1), 68-76
58. Aragno, M., Tomasinelli, C. E., Vercellinato, I., Catalano, M. G., Collino, M., Fantozzi, R., ... & Boccuzzi, G. (2009). SREBP-1c in nonalcoholic fatty liver disease induced by Western-type high-fat diet plus fructose in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(7), 1067-1074.

59. Li, L., Lu, D. Z., Li, Y. M., Zhang, X. Q., Zhou, X. X., & Jin, X. (2014). Proteomic analysis of liver mitochondria from rats with nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(16), 4778.
60. Serviddio, G., Sastre, J., Bellanti, F., Viña, J., Vendemiale, G., & Altomare, E. (2008). Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Molecular aspects of medicine*, 29(1-2), 22-35.
61. Evangelista, Fabiana S., et al. "Physical training improves body weight and energy balance but does not protect against hepatic steatosis in obese mice." *International journal of clinical and experimental medicine* 8.7 (2015): 10911.
62. Ok, Duck-Pil, Kangeun Ko, and Ju Yong Bae. "Exercise without dietary changes alleviates nonalcoholic fatty liver disease without weight loss benefits." *Lipids in health and disease* 17.1 (2018): 207.
63. Rosa-Caldwell, Megan E., et al. "Moderate physical activity promotes basal hepatic autophagy in diet-induced obese mice." *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 42.2 (2016): 148-156.
64. Le page C, Noirez P, Courty J, Riou B, Swynghedauw B, Besse S. Exercise training improves functional post-ischemic recovery in senescent heart. *Experimental gerontology*.2009;44(3):177-82.
65. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological chemistry*. 1972;247(10):3170-5.
66. Aebi H. Catalase in vitro, 1984.121-6p
67. Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 52, pp. 302-310). Academic Press.
68. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in enzymology*. 233: Elsevier; 1994. p. 357-63.
69. Walmsley T, Abernethy M, Fitzgerald H. Effect of daylight on the reaction of thiols with Ellman's reagent, 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Clinical chemistry*. 1987;33(10):1928-3
70. Hissin PJ, Hilf R. A. fluorometric method for determination of oxidized and reduces glutathione in tissues. *Analytical biochemistry*.1976;74(1):214-26.

71. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*. 1974;249(22):7130-9.
72. Mayer, J., Russell, R. E., Bates, M. W., & Dickie, M. M. (1953). Metabolic, nutritional and endocrine studies of the hereditary obesity, diabetes syndrome of mice and mechanism of its development. *Metabolism*, 2, 9-21.
73. Garthwaite, T. L., Martinson, D. R., Tseng, L. F., H, T. C., & Menahan, L. A. (1980). A Longitudinal Hormonal Profile of the Genetically Obese Mouse. *Endocrinology*, 107(3), 671-676.
74. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*. 2013;3(3):71.
75. WESTMAN, S. (1968). Development of the obese-hyperglycemic syndrome in mice. *Diabetologia*, 4(3), 141-149.
76. EDVELL, A., & LINDSTRÖM, P. (1995). Development of insulin secretory function in young obese hyperglycemic mice (Umeå obob). *Metabolism*, 44(7), 906-913.
77. HERBERG, L., MAJOR, E., HENNIGS, U., GRÜNEKLEE, D., FREYTAG, G., & GRIES, F. A. (1970). Differences in the development of the obese-hyperglycemic syndrome in obob and NZO mice. *Diabetologia*, 6(3), 292-299.